

Experimentelle Prüfung der Wirksamkeit
einer Lebendvaccine gegen die
Pustular-Dermatitis beim Schaf (Ecthyma)

Frauke von Buchholz

Disbui. München

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0078

Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c.mult. A. Mayr

Experimentelle Prüfung der Wirksamkeit
einer Lebendvaccine gegen die
Pustular-Dermatitis beim Schaf (Ecthyma)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Frauke von Buchholz geb. Monreal
aus
Nastätten

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. E. Munz

Tag der Promotion: 27. Februar 1987

1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Schrifttum zur Wirksamkeitsbestimmung von Pockenimpfstoffen</u>	3
2.1. Nachweis einer humoralen Immunität	4
2.1.1. Pockengenera, die nur zu einer geringfügigen Antikörperbildung führen	5
2.1.2. Pockengenera, die gute Antikörper-Induzenten repräsentieren	8
2.2. Nachweis einer zellulären Immunität	11
2.3. Nachweis einer Pockenimmunität durch eine Challenge- Infektion mit virulentem Feldvirus	15
3. <u>Eigene Untersuchungen</u>	18
3.1. Material und Methoden	18
3.1.1. Versuchstiere	18
3.1.2. Versuchsvaccine	18
3.1.3. Virus-Stamm für die Belastungsinfektion	19
3.1.4. Zellkulturen	19
3.1.5. Virusvermehrung	20
3.1.6. Reisolierung von Orf-Virus aus Biopsiematerial	21
3.1.7. Virusfällung mit Polyäthylenglykoll	21
3.1.8. Durchführung der Impfung	22
3.1.9. Durchführung der Belastungsinfektion	22
3.1.9.1. Intravenöser Challenge	22
3.1.9.2. Intrakutantest	23
3.1.9.3. Skarifikationsversuch	24
3.1.10. Mikroneutralisationstest	25
3.1.10.1. Absorption der Seren	25
3.1.10.2. Neutralisationstest	25
3.1.11. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	26
3.1.11.1. Virusanreicherung	26
3.1.11.2. Verwendete Pufferlösungen	27

	Seite
3.1.11.3. ELISA-Platten	28
3.1.11.4. Seren	28
3.1.11.5. Konjugat	28
3.1.11.6. Substrat	29
3.1.11.7. Photometrische Messung	29
3.1.11.8. Durchführung des ELISA	29
3.2. Ergebnisse	32
3.2.1. Impfung mit der Orf-Vaccine	32
3.2.2. Belastung der Tiere mit Orf-Feldvirus	32
3.2.2.1. Intravenöse Belastung	33
3.2.2.2. Intrakutantest	34
3.2.2.2.1. Intrakutantests an geimpften und intravenös belasteten Tieren (Gruppe 1)	35
3.2.2.2.2. Intrakutantests an nicht geimpf- ten, aber intravenös belasteten Tieren (Gruppe 6)	42
3.2.2.2.3. Intrakutantests an geimpften und nicht belasteten Tieren (Gruppe 3)	45
3.2.2.2.4. Intrakutantests an nicht geimpf- ten und nicht belasteten Tieren (Gruppe 8)	48
3.2.2.3. Skarifikationsversuch	51
3.2.3. Serologie	54
3.2.3.1. Neutralisationstest	54
3.2.3.1.1. Auswahl der Methodik	54
3.2.3.1.2. Nachweis neutralisierender Serumantikörper	55
3.2.3.1. Serumantikörper im ELISA	57
4. <u>Besprechung der Ergebnisse</u>	68
5. <u>Zusammenfassung</u>	73
6. <u>Summary</u>	74
7. <u>Literaturverzeichnis</u>	75

1. Einleitung

In den vergangenen Jahren hat die Pustular-Dermatitis der Schafe und Ziegen, die durch ein Parapocken-Virus hervorgerufen wird, eine immer größere Bedeutung durch den zunehmenden bösartigen Verlauf erlangt. Teilweise bringt man dies auch damit zusammen, daß die schon seit langem bekannten klinisch inapparenten Infektionen vermehrt in Krankheiten konvertieren. Besonders durch die intensive Schafhaltung wird dieser Trend begünstigt. Hier führt die Erkrankung, die auch unter den Namen Ecthyma contagiosum, Orf oder Lippengrind bekannt ist, vor allem bei sehr jungen Lämmern, die an der Lammbär gehalten werden, zu hohen Verlusten. Ein Grund dafür liegt in der Tatsache, daß therapeutisch lediglich die Symptome gemildert werden können. So wurde auch hier, wie bei allen anderen Pockenerkrankungen, eine Prophylaxe mittels Schutzimpfung angestrebt.

Zur Entwicklung und Anwendung von Vaccinen gegen das Orf-Virus wurden daher viele Versuche unternommen, von denen aber fast alle entweder eine zu geringe oder keine immunisierende Wirkung hatten oder zu Ecthyma-Erkrankungen führten (10, 39, 73, 95).

ZACH stellte auf der Basis des von MAYR gewonnen Orf-D 1701 Stammes eine Lebendvaccine her, die subkutan verabreicht wird und deren Unschädlichkeit überprüft wurde. Anhaltspunkte für eine immunisierende Wirkung ließen sich in Feldversuchen nachweisen (52, 95).

Da sich die Immunitätsverhältnisse nach einer Infektion mit Pockenviren im allgemeinen schwieriger erfassen lassen als nach vielen anderen Virusinfektionen, ist es auch komplizierter, die Wirksamkeit einer solchen Vaccine nachzuweisen. Vor allem nach einer Infektion mit Parapocken ist der alleinige Nachweis einer humoralen Immunität nicht aufschlußreich, da hier zelluläre Immunkomponenten die entscheidende Rolle spielen (10, 11).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Wirksamkeit der Orf-

Vaccine D 1701 zu objektivieren und unter kontrollierten Bedingungen mittels verschiedener Challenge-Infektionen und serologischer Tests die zelluläre und humorale Immunität zu prüfen, sowie die zuverlässigsten Nachweismethoden einer Immunität gegen das Orf-Virus herauszustellen.

2. Schrifttum zur Wirksamkeitsbestimmung von Pockenimpfstoffen

Der spezifische Schutz gegen Erkrankungen durch eine Infektion mit Pockenviren beruht sowohl auf humoralen als auch auf zellulären Abwehrmechanismen (28). Außerdem spielt die lokale Immunität an der Eintrittspforte des Erregers eine Rolle bei der Infektabwehr.

Der Nachweis einer Pocken-Immunität ist aus verschiedenen Gründen notwendig. Für die Erforschung und ständige Kontrolle des Vorkommens und der Verbreitung von Pockeninfektionen in Populationen ist der Erregernachweis nur bedingt brauchbar. Die Methode der Wahl ist sowohl beim Einzelindividuum als auch bei Populationsuntersuchungen der Nachweis abgelaufener Immunreaktionen, d.h. der Nachweis von Antikörpern bzw. zellulären Immunphänomenen. Für die praxisorientierte Epidemiologie besitzt die Serologie die größte Bedeutung. Bezüglich Antikörperbildung unterscheiden sich die einzelnen Pockeninfektionen aber sehr stark. Bildung und Verweildauer von Antikörpern schwanken in weiten Grenzen. Nur ein positiver Befund ist deshalb beweisend. Seronegative Tiere können durchaus eine Pockeninfektion durchgemacht haben. In Einzelfällen läßt sich dies über zelluläre Immunreaktionen erfassen. Die für eine Pocken-Immunität typische "delayed type hypersensitivity" ist jedoch nur von kurzer Dauer.

Im experimentellen Bereich ist der Nachweis einer Immunität zur Kontrolle der Effektivität von Schutzimpfungen und zur Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen, speziell von neu entwickelten Vaccinen, unverzichtbar. Für den Wirksamkeitsnachweis sind dabei sowohl eine Antikörperbildung wie die zelluläre Komponente zu berücksichtigen. Letztere läßt sich als Beweis einer abgelaufenen Immunreaktion nach Pocken-Antigenkontakt stets über eine gewisse Zeit dokumentieren.

Die sicherste Aussage über die Wirksamkeit eines Impfstoffes erhält man aber über den direkten Schutztest mittels Challenge-Infektion mit virulentem Feldvirus (48). Die Testinfektion kann dabei systemisch wie lokal erfolgen. Nicht alle Pockenviren führen nach parenteraler Applikation bei gesunden, empfänglichen Tieren zu einer ge-

neralisierten Krankheit. Dem lokalen Challenge kommt deshalb eine überragende Aussagekraft zu. Er kann perkutan (Skarifikationsmethode) oder intrakutan durchgeführt werden. Eine Korrelation zwischen Antikörperbildung und Nachweis einer Pocken-Immunität ist nur dann gegeben, wenn humorale Abwehrmechanismen die Basis einer Schutzwirkung haben. Die Höhe der Antikörpertiter läuft dem tatsächlichen Schutz jedoch nicht parallel.

2.1. Nachweis einer humoralen Immunität

Die humorale Immunität beruht auf der Bildung von Antikörpern, die bei den verschiedenen Pockenerkrankungen eine unterschiedliche Schutzwirkung haben können. Die humoralen Antikörper werden in den sich aus B-Lymphozyten nach Antigenkontakt bildenden Plasmazellen gebildet und aus diesen freigesetzt. So können nach einer stattgefundenen Pockeninfektion eine Reihe virusspezifischer Antikörperarten (neutralisierende, komplementbindende, hämagglutinationshemmende und präzipitierende Antikörper) nachgewiesen werden. Bei den verschiedenen Pockenkrankheiten werden im Vergleich zu anderen Virusinfektionen jedoch relativ wenig virusneutralisierende Antikörper gebildet (28). Im Ganzen gesehen kann mit Hilfe serologischer Methoden zum Nachweis humoraler Antikörper bei Pockeninfektionen nur mit Einschränkung eine Aussage über die Immunitätslage gemacht werden. Abgesehen davon, daß mit den verschiedenen Methoden des Antikörpernachweises unterschiedliche Arten von Antikörpern ermittelt werden, ist auch die Sensibilität der einzelnen Tests unterschiedlich. Der Nachweis der verschiedenen humoralen Antikörperklassen dürfte eher von indirekter als von direkter Bedeutung für die Immunitätslage sein, insbesondere auch insofern, als eine Pocken-Immunität stets auf beiden, den humoralen und zellulären Mechanismen beruht (85).

Immunologisch gesehen lassen sich die einzelnen Pockengenera in

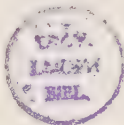
zwei Gruppen aufteilen: die eine Gruppe umfaßt die Genera, die zu einer relativ guten Antikörperbildung führen (z.B. Variola, Vaccinia und Schafpocken), die andere Gruppe umfaßt Genera, die als schwache Induzenten einer Antikörperbildung anzusehen sind (z.B. Parapox und Avipox).

2.1.1. Pockengenera, die nur zu einer geringfügigen Antikörperbildung führen

Antikörperbildung bei Parapox-Infektionen, Beispiel: Orf

Nach einer natürlichen oder experimentellen Infektion mit Orf-Virus können neutralisierende (1, 10, 24, 44, 46, 47, 52, 61, 67, 95), komplementbindende (1, 40, 47, 75, 76, 79), präzipitierende (1, 24), agglutinierende (1), im indirekten Immunofluoreszenztest markierbare (40) und im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) nachweisbare (11, 40, 54) Antikörper gefunden werden. Sie treten in den ersten vier Wochen nach der Infektion auf (1, 13, 47, 75), erreichen ihren Gipfel fünf Wochen post infectionem (40, 47) und persistieren bis zu fünf Monaten (1, 13, 40, 47, 79). Die Antikörpertiter sind allerdings sehr gering (10, 24, 46, 47, 79).

Im Neutralisationstest kann die Zugabe von Komplement zu dem Neutralisationsgemisch den neutralisierenden Effekt der Antikörper verstärken (67). Häufig werden jedoch nach stattgefundener Infektion, vor allem auch bei jungen Tieren, keine neutralisierenden Antikörper gefunden (51, 79, 87). Auch im ELISA sind nach natürlicher Infektion oft keine Antikörper festzustellen. Der indirekte Immunofluoreszenztest scheint die sensitivste diagnostische Methode zum Nachweis humoraler Antikörper nach Orf-Infektionen zu sein (40).



Mit Sicherheit ist kein serologischer Test so zuverlässig, daß er zur Ermittlung des Immunstatus eines Tieres geeignet ist (74), da auch keine Korrelation zwischen dem Antikörpertiter und dem Schutz gegen eine Folgeinfektion besteht (11, 24, 40). Die Ausbildung zirkulierender Antikörper nach einer Ecthyma-Infektion oder einer Orf-Schutzimpfung ist beim Schaf individuell sehr verschieden. Dabei spielen Booster-Effekte nach mehrmaliger Auseinandersetzung mit dem Erreger eine große Rolle (52). Humorale Mechanismen dürften bei der Regression stärkerer Läsionen infolge einer Orf-Infektion von Bedeutung sein (40).

Allgemein ist zu sagen, daß der Nachweis von Antikörpern ein Beweis dafür ist, daß das betreffende Tier eine Infektion oder Schutzimpfung mit Ecthyma-Virus durchgemacht hat; der umgekehrte Schluß ist jedoch nicht zulässig.

Anders liegt der Fall bei sehr jungen Lämmern. Werden bei diesen Antikörper nachgewiesen, so handelt es sich in der Regel um passiv übertragene, maternale Antikörper, die also im Serum von Tieren gefunden werden können, ohne daß diese selbst eine Infektion durchgemacht haben. Sofern überhaupt maternale Antikörper übertragen werden, sollen diese jedoch keine langdauernde belastbare Schutzwirkung bei den Lämmern haben (8, 11, 39, 52, 73, 80). Nur wenige Autoren berichten von Schutzwirkungen bei Lämmern durch maternale Antikörper (44, 45, 67). Die Immunisierung tragender Schafe soll einen besseren Schutz für die Lämmer vermitteln, da hierdurch der Antikörpergehalt des Kolostrums und der Milch ansteigt (67). Die Antikörper in der Muttermilch sollen jedoch nur eine lokale und keine systemische Schutzwirkung im Digestionstrakt und hier vor allem im Maulbereich der Lämmer besitzen (44).

Antikörperbildung bei Geflügelpocken-Infektionen (Avipox)

Die Fähigkeit zur Ausbildung einer humoralen Immunität nach einer Infektion mit Geflügelpocken gilt als sicher, jedoch ist es fraglich, ob eine direkte quantitative Beziehung zwischen der Menge der gebildeten Antikörper und einer Immunität besteht (94). Selbst ein erwachsenes Huhn bildet nur in sehr geringem Umfang zirkulierende Antikörper gegen Geflügelpocken, so daß hier die humorale Immunität besonders schwer zu erfassen ist (20).

Nach einer Avipox-Infektion können präzipitierende (23, 35, 84, 91, 93), mit der Komplementbindungshemmungsreaktion nachweisbare (88), neutralisierende (56, 84, 89), hämagglutinationshemmende (16, 86) und im ELISA feststellbare (12, 84) Antikörper im Serum vorkommen. Präzipitierende Antikörper werden zwei bis drei Wochen nach der Infektion gefunden (84, 93); sie persistieren über zwei Wochen, wobei die Stärke der Antikörperproduktion von der Dosis des inkorporierten Virus abhängig ist (93). Mit dem passiven Hämagglutinationstest gelingt schon in der ersten Woche nach der Infektion ein Antikörpernachweis (86). Neutralisierende Antikörper treten zwei Wochen nach der Infektion auf (56, 89). Eine Korrelation zwischen dem Titer der neutralisierenden Antikörper und dem Titer des infektiösen Virus oder der Genesungszeit besteht nicht. Trotzdem kann eine Bedeutung der humoralen Abwehr gegen Hühnerpocken nicht geleugnet werden (57). Der ELISA ist ein besonders sensibler Test, um Antikörper nachzuweisen. Allerdings sind über Zusammenhänge zwischen dem im ELISA gefundenen Antikörpertiter und dem Schutz gegen Hühnerpocken noch weitere Untersuchungen nötig (12).

2.1.2. Pockengenera die gute Antikörper-Induzenten repräsentieren

Antikörperbildung bei Vaccinia - Variola Infektionen

Zwischen der Immunität gegen Vaccinia- oder Variolaerkrankungen und den im Serum vorhandenen Antikörpern besteht eine enge Beziehung. Die neutralisierenden Antikörper bilden die Grundlage der humoralen Immunität. Sind sie in einem Organismus vorhanden, so ist dieser gegen eine nachfolgende natürliche Infektion in der Regel immun. Es gibt jedoch Fälle, bei denen sich keine neutralisierenden Antikörper nachweisen lassen - was nicht besagt, daß keine vorhanden sind - und trotzdem noch eine solide Immunität besteht. Von besonderer Bedeutung sind hier die hämagglutinationshemmenden Antikörper, die ungefähr zur gleichen Zeit wie die neutralisierenden entstehen und etwa gleich lange persistieren. Allerdings schwankt bei jeder Verlaufsform einer Variolaerkrankung der Antikörperspiegel sehr stark von Patient zu Patient (30). Wenn hämagglutinationshemmende Antikörper auftreten, ist der betreffende Organismus auch gegen eine nachfolgende Infektion immun, seltener teilimmun. Der umgekehrte Schluß ist auch hier nicht möglich (30). So zeigte sich in Immunisierungsversuchen mit Vaccinia-Virus gegen Mäusepocken, daß immunisierte Tiergruppen mit nachweisbaren Titern hämagglutinationshemmender Antikörper in der Regel gegen Testinfektionen immun waren, aber das Fehlen von solchen Antikörpern nicht immer mit einem völlig unzureichenden Immunschutz verbunden war (60). In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß entsprechend den Ergebnissen der Untersuchungen von HORZINEK und HOPKEN die Hämagglutinationshemmungsreaktion auch wertvolle Aufschlüsse zur Überprüfung der Immunitätsverhältnisse bei der Ektromelie der Maus ergibt (33).

Der Titer neutralisierender Antikörper gegen das Vacciniavirus zeigt auch den Grad der Wirksamkeit gegen das Variolavirus an (29); das Vorhandensein von heterologen Antikörpern ist somit ein brauchbarer Immunitätsnachweis (32).

In vielen anderen Arbeiten, in denen die Wirksamkeit einer Vaccine gegen eine Variolaerkrankung untersucht wurde, wird dem Vorhandensein von Antikörpern und somit auch der humoralen Immunität eine wichtige Bedeutung beigemessen. Diese wird weiterhin in verschiedenen älteren Arbeiten aus der Praxis in pockenendemischen Gebieten, in denen über eine erfolgreiche Serotherapie nach stattgefundener Infektion berichtet wird (9, 17, 62, 92), unterstrichen. Im Gegensatz dazu steht nur ein Bericht über eine erfolglose Serumbehandlung (63).

Trotz der vielen positiven Berichte über einen Immunitätsnachweis gegen Variola bzw. Vaccinia mittels Feststellung des Antikörpertiters gibt es auch einen Hinweis auf das Fehlen einer engen Verbindung zwischen zirkulierenden neutralisierenden Antikörpern und der Reaktion auf eine Lebendvaccine (37).

Antikörperbildung bei Schafpocken

Nach einer Infektion mit Schafpockenviren treten neutralisierende (3, 48, 66, 68, 69), komplementbindende (15, 69, 81, 82, 90) und mit dem Coombs-Test nachweisbare Antikörper auf. Dieser Test ist für den Nachweis von Antikörpern, die oft mit der Agglutinationsreaktion und dem Neutralisationstest nicht feststellbar sind, sicher sehr sensitiv (4).

Komplementbindende Antikörper können im Serum infizierter Schafe schon in den ersten fünf bis sieben Tagen nach der Infektion nachgewiesen werden. Das Titermaximum wird zwischen 14 und 21 Tagen post infectionem erreicht (90).

Der Titer neutralisierender Antikörper wird als ein Kriterium für eine vorhandene Immunität bezeichnet. Auch spielen maternale Antikörper bei der Immunität von Sauglämmern eine Rolle (68).



Abb. 1: Antikörperbildung nach Pockenviruskontakt

Schema zum Vergleich guter und schlechter Antikörper-Induzenten unter den Vertretern der Familie Poxviridae

RED'KO beschreibt die prophylaktische Anwendung von Serum rekonvaleszenter Schafe (71). Im Gegensatz dazu sollen nach RAMYAR und HESSAMI kaum Beziehungen zwischen serumneutralisierenden und komplexbindenden Antikörpern einerseits und der tatsächlich vorhandenen Immunität andererseits bestehen (69).

2.2. Nachweis einer zellulären Immunität

Die Rolle der zellulären Immunität nach einer Vacciniainfektion wurde zuerst von PIRQUET beobachtet (65). Nach WITTMANN und MAYR beruht bei Infektionen durch Pockenviren die Immunitätsbildung und der Schutz mehr auf zellulären als auf humoralen Mechanismen (94), wie dies auch bereits von HERRLICH hervorgehoben wurde (28).

Die Grundlage der zellulären Immunität bilden die T-Lymphozyten. Das Zusammenwirken der verschiedenen Zellen bei der zellvermittelten Immunität erfordert ein intaktes Immunsystem, das durch zahlreiche Mediatoren, die Zytokine, kontrolliert wird (72).

Die spezifische zellvermittelte Immunität bewirkt z.B. eine Überempfindlichkeit, die sich in Form einer allergischen Reaktion vom verzögerten Typ (delayed type hypersensitivity) äußern kann. Ein anderer sofort einsetzender zellulärer Abwehrmechanismus ist z.B. die T-zellvermittelte Zytotoxizität (72). Der Nachweis für das Vorhandensein von spezifischen Gedächtniszellen (memory-Funktion) kann in vivo durch die Provokation einer allergischen Reaktion vom verzögerten Typ (delayed type hypersensitivity) erbracht werden. Erstmals wurde dieses Phänomen bereits von JENNER beschrieben (34). Er beobachtete bei einer Frau nach Inokulation von Pockenmaterial "bald" an der Inokulationsstelle eine rote Effloreszenz, die sich ziemlich stark ausbreitete, aber in wenigen Tagen abheilte, ohne sich zu einer richtigen Pocke zu entwickeln. Die Frau hatte sich Jahre zuvor mit

einer Kuhpockenerkrankung auseinandergesetzt. Es handelt sich hier um den gleichen Effekt, der später von KOCH (1890) nach der subkutanen Applikation von Tuberkulin bei Tuberkulosepatienten beobachtet wurde. In beiden Fällen waren die Reaktionen im Prinzip dieselben. Der erste Antigenkontakt macht das Individuum spezifisch sensibel gegen einen erneuten Kontakt. Typisch ist die Entwicklung einer charakteristischen Hautveränderung an der Injektionsstelle, die beim ersten Antigenkontakt nicht auftritt.

Nach STICKL et al. ist der einfachste Nachweis einer vaccinalen Basisimmunität gegen Vaccinia- oder Variola-Virus die Inokulierung mit virulentem Vaccinia-Virus und die nachfolgende Beurteilung der Impfreaktion. Die Autoren weisen auf die unterschiedlichen klinischen Hauterscheinungen bei einer Erstimpfreaktion und einer Wiederimpfreaktion hin (83). Auch HERRLICH beschreibt zwei Reaktionstypen. Die Wiederimpfreaktion zeichnet sich im Prinzip durch den gleichen Ablauf wie die erste Reaktion aus, die einzelnen Stadien der Pustelbildung verlaufen allerdings stark verkürzt. Es kann sich aber auch eine "Sofortreaktion" (Arthusphänomen) mit Rötung der Impfstelle nach wenigen Stunden und schnellem Verschwinden ausbilden. Eine andere Hautreaktion zeichnet sich durch Bildung einer kleinen Papel aus, die 24 bis 48 Stunden nach der Impfung entsteht und nach einigen Tagen wieder verschwindet. Auf diese Weise soll der Grad der vorhandenen Immunität bestimmt werden können (28). Dem entgegen steht eine Behauptung, daß der Grad der Immunität einer Person gegen Vaccinia- oder Variola-Virus nicht allein durch die Antwort auf eine kutane Infektion mit Impfvirus bestimmt werden kann (38).

Als Nachweismethoden zur Erkennung einer Pockenimmunität werden der Intrakutantest (0,1 ml des Antigens werden intrakutan injiziert) oder das Einreiben von Pockenvirus in die Haut (Skarifikation) in vivo praktiziert (siehe auch Kapitel 2.3.).

Der Intrakutantest läßt sich z.B. zum Nachweis einer Immunität gegen Orf-Virus bei geimpften Lämmern mit hitzeinaktiviertem Virus durchführen (11). Der Intrakutantest kann aber ebenso gut durchgeführt werden,

um festzustellen, ob Lämmer vor einer Impfung schon mit Orf-Virus infiziert worden waren (74). Die Entwicklung einer Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ gegen Orf-Virus-Antigen oder die Induktion eines Immunschutzes nach einer Impfung werden nicht durch die Übertragung maternalen Antikörper via Kolostrum beeinflusst (11).

Bei Rindern kommt es nach heterologer Impfung mit einem Orf-Lebendimpfstoff gegen Stomatitis papulosa bei geringer Antikörperbildung zu einer starken Kreuzreaktion der Impflinge im Intrakutantest (13).

Auch zur Überprüfung der Wirksamkeit einer Vaccine gegen Schafpocken wird dieser Test durchgeführt. Bei immunen Tieren muß der Test positiv verlaufen (48).

Zum Nachweis einer zellulären Immunität gegen Hühnerpocken wird der Intrakutantest am Kehllappen durchgeführt. (22, 64). Eine positive Reaktion kann 12 bis 14 Tage nach der Infektion mit Hühnerpockenvirus hervorgerufen werden (64).

Auch in vitro kann der Nachweis für das Vorhandensein einer zellulären Immunität gegen Pocken erbracht werden. Die in-vitro-Methoden setzen voraus, daß geeignete Zielzellen für die Erkennung der Wirkung der Effektorzellen zur Verfügung stehen. Nach einer Vaccinia-Infektion treten z.B. virusspezifische Glycoproteine auf, die zu einem erheblichen Anteil in die Zellmembran integriert werden (58). An infizierte Zellen binden spezifische Antikörper, die nach Aktivierung der Komplementkaskade über T-Killerzellen zur Zell-Lysis führen. Virusspezifische Antigene, die auf den Zelloberflächen exprimiert werden, unterscheiden sich von den mit der Neutralisation nachweisbaren Antigenen von extrazellulärem Virus. Neutralisierende Antikörper allein führen nicht zu einer komplementabhängigen Zell-Lysis (2, 5). Gegen Parapoxvirus-Antigen jedoch konnte mit einem Chrom⁵¹-Freisetzungstest sowohl eine T-Killerzell-vermittelte als auch eine Antikörper-vermittelte Zytotoxizität nachgewiesen werden (21, 48). Die höchsten Titer zytotoxischer Antikörper wurden immer nach der Rückbildung der Läsionen festgestellt. Nach erneuter Virusexposition entstanden kei-

ne signifikanten Titeranstiege (40).

Der Nachweis einer eindeutig T-Zell-gebundenen Zytotoxizität kann auch bei Mäusen gegen das Ektromelievirus erbracht werden. Bereits zwei Tage nach der Infektion der Mäuse haben Milzzellen im Chrom-Freisetzungs-Test eine eindeutig lytische Wirkung auf Zielzellen, die mit Ektromelievirus infiziert wurden und die Virus-Antigene auf ihrer Oberfläche tragen. Sechs Tage nach Infektion zeigen T-Splenozyten die höchste Aktivität (25, 26). Nach Immunisierung mit Vaccinia-Virus werden die gleichen Ergebnisse erzielt (41). Die nach einer Infektion sehr früh (innerhalb der ersten Stunde post infectionem) auf den infizierten Zellen exprimierten Antigene genügen, um spezifische zytotoxische T-Lymphozyten zu sensibilisieren. Diese frühen Antigene erscheinen in den Zellen vor dem Beginn der Virus-DNS-Synthese. Daher repräsentiert diese in vitro feststellbare Zytotoxizität einen sofort einsetzenden Schutzmechanismus (42).

Die Bedeutung der Thymus-abhängigen T-Zell-vermittelten Immunität, speziell bei der Abwehr von Pockenvirus-Infektionen, wurde durch Versuche mit verschiedenen Tierarten z.B. nach Anti-Thymozyten-Serum-Behandlung gezeigt (6, 7, 18, 31, 55, 57). Morbidität und Mortalität nach einer experimentellen Infektion mit Pockenviren sind bei allen Tieren, die keinen oder einen geschädigten Thymus haben, verglichen mit thymuskompetenten Kontrolltieren, stark erhöht. MORITA stellte die bedeutendere Rolle der zellulären Immunität gegen Geflügelpocken an thymektomierten und bursektomierten Küken dar. Die Genesung ist abhängig vom Vorhandensein einer zellulären Immunität (57).

Ein weiterer Nachweis für die zellvermittelte Immunität ist der Leukozyten-Migrations-Hemmungstest mit Milzzellen. Bei diesem Test kann durch Bestimmung der Distanz der auswandernden Makrophagen die Bildung von antigenspezifischem migrations-hemmendem Faktor bestimmt werden (22, 57). Der Virustiter in den durch Hühnerpockenvirus hervorgerufenen Läsionen korreliert zwei Wochen nach der Infektion mit der größten Migrations-Hemmung. Es besteht eine Übereinstimmung des Testergebnisses mit der Genesungszeit in der vierten Woche nach der

Infektion (57). DHARSANA und SPRADBROW verglichen den Leukozyten-Migrations-Hemmtest mit dem Intrakutantest nach Impfung gegen Hühnerpocken. Bei beiden Methoden trat am fünften Tag nach der Impfung eine positive Reaktion auf. Der Vorteil des erstgenannten Tests besteht in der Möglichkeit, auch Reihenuntersuchungen an einem Tier durchführen zu können. Weder der Leukozyten-Migrations-Hemmtest noch der Intrakutantest erlaubt allerdings eine quantitative Messung der zellvermittelten Immunität. Trotzdem sind beide Nachweismethoden einer zellulären Immunität notwendig, um die Reaktion auf eine Impfung gegen Geflügelpocken zu überprüfen (22).

Daß dem Makro- und Mikrophagen im Rahmen der unspezifischen zellulären Abwehr gegen Pocken eine besondere Bedeutung zukommt, ist nicht zu bezweifeln. Im histologischen Bild stellen sie die überwiegende zelluläre Komponente der mononukleären Zellinfiltrate bei Immunreaktionen vom verzögerten Typ dar (78).

2.3. Nachweis der Pockenimmunität durch eine Challenge-Infektion mit virulentem Feldvirus

Um bei einem Tier oder einer Gruppe von Tieren eine schutzvermittelnde Immunität gegen eine Pockenerkrankung festzustellen, ist die Belastungsinfektion die sicherste und auch die älteste Methode. Vor allem für den Nachweis der Wirksamkeit eines Impfstoffes kann auf diesen direkten Schutzversuch oft nicht verzichtet werden (51, 69). Eine Belastungsinfektion erlaubt die Beurteilung der gesamten Immunsituation eines Tieres. Mit Hilfe klinischer Untersuchungen beim Ablauf einer Testinfektion sowie durch detaillierte Bestimmungen der humoralen und zellvermittelten Immunität mit geeigneten Methoden können Aufschlüsse über die gesamte Abwehr und daneben über eine eventuell nur lokal vorhandene Immunität gewonnen werden (52).

Für die Durchführung von Belastungsinfektionen werden in der Lite-

ratur die verschiedensten Methoden angegeben, die sich vor allem in der Art der Applikation eines Challenge-Agens unterscheiden.

Eine wichtige Methode, die vor allem über den Status einer zellulären Immunität nach Pockenantigen-Kontakt Auskunft gibt, ist die Skarifikationsmethode. Diese besteht in dem Einreiben z.B. eines Pockenvirus in die Haut, nachdem zuvor ein Hautareal aufgerauht (skarifiziert) worden ist. Beim Geflügel entspricht dieser Applikationsart die sogenannte Federfollikelmethode, bei der das Virus nach Entfernen einiger Federn in die offenen Federfollikel eingerieben wird (10, 11, 19, 27, 50, 52, 53, 60, 79). Das Auftreten einer typischen Wiederimpfreaktion gilt als Beweis einer vorhandenen Immunität (19, 20, 27, 53, 70). Die zelluläre Reaktion gegenüber Pockenvirus kann an verschiedenen Stellen des Hautorgans unterschiedlich stark zum Ausdruck gebracht werden (79).

Es treten z.B. nach erfolgreicher Impfung von Lämmern (Intrakutan-test positiv; 11) keinerlei Parapox-Läsionen nach der kutanen Testinfektion auf (11, 52). Die kutane Orf-Infektion nicht immuner Tiere bewirkt dagegen an der Infektionsstelle in der Regel eine starke Pustelbildung, wobei erhebliche Unterschiede bestehen, ob virulentes Feldvirus oder attenuierte avirulente Virusstämme zur Anwendung kommen. Eine generalisierte Erkrankung tritt jedoch auch nach Feldvirus-Skarifizierung nur bei einem Teil der Tiere auf (19). Diese Beobachtung ist aus allen Berichten über Testinfektionen bei ungeimpften Tieren zu entnehmen. Vielfach wurde daher versucht, mit Hilfe intravenöser Applikation verschiedener Pockenviren eine generalisierende Infektion herbeizuführen (19, 27, 32, 50, 53, 60). Das Auftreten von generalisierten Pocken ist für das Fehlen einer Immunität beweisend (50, 53). Eine weitere Methode, die "zentrale Immunität" zu prüfen, sehen HERRLICH et al. in der intraperitonealen Applikation des Testvirus (29).

Schließlich ist im Zusammenhang mit dem Nachweis einer Pockenimmunität auch die Untersuchung über das Vorliegen einer lokalen Schleimhautimmunität von Bedeutung. DANNER et al. sowie MAYR und DANNER konn-

ten bei ihren Versuchen mit der oralen Impfung mit attenuiertem Hühnerpockenvirus nachweisen, daß die auf diesem Wege geimpften Hühner neben einer belastbaren systemischen Immunität auch über einen starken Haut- und Schleimhautschutz verfügen, der nach intravenöser, kutaner und oraler Belastung nachzuweisen war (20, 50).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Versuchstiere

Für die Untersuchungen standen insgesamt 25 Schaflämmer zur Verfügung. 14 Lämmer stammten aus einer privaten Schafzucht, 10 aus der Bayerischen Landesanstalt für Tierzucht, ein weiteres wurde später aus dem institutseigenen Bestand hinzugezogen. Die neu eingestellten Lämmer wurden 24 Stunden nach der Geburt - sie hatten alle mütterliches Kolostrum erhalten - abgesetzt und mutterlos mit Lämmermilchaustauscher (Salvana Tiernahrung GmbH, Elmshorn-Sparriershoop), Lämmerkorn und Heu aufgezogen. Bei allen Lämmern handelte es sich um Zwillinge oder Drillinge. 10 Tiere wurden als Impflinge verwendet und 15 dienten als Kontrolltiere. Die Aufstallung der Lämmer erfolgte nacheinander in Gruppen von zwei bis sechs Tieren. Nichtgeimpfte Kontrolltiere wurden im Isolierstall des Institutes völlig abgeschirmt von den anderen Lämmern gehalten. Ferner wurden noch drei institutseigene Ziegenlämmer (Drillinge) mit in die Untersuchungen einbezogen, die mit der Mutter zusammen gehalten und mit Heu zugefüttert wurden. Zwei Tiere wurden geimpft, eins zur Kontrolle herangezogen.

3.1.2. Versuchsvaccine

Verwendet wurde eine im Institut auf bovinen embryonalen Lungenzellen (BEL) hergestellte Orf-Lebendvaccine mit der Bezeichnung: Orf-Vaccine D 1701 G 008, 3, BEL. Die Grundlage des Impfstoffes

bildete ein im Institut in Zellkultur-Wechselfassagen attenuiertes Orf-Virus, Stamm D 1701, das über die Plaque-Endverdünnungs-Technik gereinigt worden war (95). Die Vaccine lag portionsweise lyophilisiert vor und war mit 10 ml Aqua dest. aufzulösen. Sie hatte einen Titer von $10^{6,85}$ Kulturinfektiosen Dosen₅₀ pro Milliliter (KID₅₀/ml). Eine Impfdosis wurde mit $10^{7,03}$ KID₅₀/ml, d.h. 1,5 ml festgelegt.

3.1.3. Virus-Stamm für die Belastungsinfektion

Für die Belastungsinfektion (Challenge) mit virulentem Virus wurde aus der Institutssammlung der für die embryonale Lammnieren-Zellkultur (ENL) am stärksten virulente Orf-Virus-Feldstamm mit dem höchsten Titer ausgewählt. Es handelte sich um ein Feldisolat, das von KRETZDORN 1983 in Japan gewonnen wurde - Orf-Virus S1 Japan- (43). Dieses Feldisolat war zunächst auf heterologen bovinen embryonalen Hodenzellen (BET) angezüchtet und vermehrt (2 Passagen) worden. Es wurde dann für die Infektion der Lämmer und Ziegen auf embryonalen Lammnierenzellkulturen (ENL) weitervermehrt. In den Versuchen kam die 3. ENL-Passage mit einem Titer von $10^{7,5}$ KID₅₀/ml und die 4. ENL-Passage mit einem Titer von $10^{8,0}$ KID₅₀/ml zur Anwendung.

3.1.4. Zellkulturen

Für die Vermehrung des Orf-Virus S1 Japan wurden sekundäre Nierenzellkulturen (ENL) vom foetalen Schaf verwendet. Die Nieren wurden steril aus der Kapsel gelöst und die Rinde abpräpariert, um sie nach der üblichen Trypsinierungstechnik aufzubereiten (48). 500 000 Zellen/ml

wurden in Anzuchtmedium (EARLE-MEM mit NaHCO_3 nach den üblichen Methoden hergestellt, auf pH 7,2 eingestellt; 10 % foetales Kälberserum (FKS), Boehringer Ingelheim; 10 % Laktalbumin (LA); 100 IE Penicillin G/ml, Hoechst AG Frankfurt; 0,1 mg Streptothetat^R/ml, Grünenthal GmbH Stolberg und 2,5 µg Amphotericin B/ml, Squibb München) resuspendiert und in Glaskulturgefäßen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit Erhaltungsmedium (EARLE-MEM mit 5 % LA, 2 % FKS und den oben angegebenen Antibiotikazusätzen) versorgt. Sobald der Zellrasen dicht ausgewachsen war (Monolayer), wurden die Zellen mit Trypsin-Versen-Lösung (STV) abgelöst und im Verhältnis 1 : 2 subkultiviert (49).

Für den Serum-Neutralisationstest und die Beseitigung toxischer Serumkomponenten mittels Zellabsorption der Testseren wurden sekundäre Zellkulturen aus den Lungen drei bis vier Monate alter Rinderfeten hergestellt (49). Anzuchtmedium war EARLE-MEM ohne LA mit 5 % FKS und den oben genannten Antibiotikazusätzen; das Erhaltungsmedium enthielt nur 2 % FKS.

3.1.5. Virusvermehrung

Für die in vivo-Versuche war vorher eine ausreichende Virusreplikation des Orf-Virus-Feldstammes S1 Japan in der Zellkultur nötig. Hierzu wurde der dichtgewachsene Zellrasen (Monolayer) sekundärer ENL-Zellkulturen in Rouxschalen (100 ml) mit 2 ml Virussuspension pro Schale inokuliert. Wenn 70 % - 90 % des Zellrasens durch zytopathischen Effekt (CpE) in Form von Lysis und Abkugelung der Zellen zerstört waren, wurde das Virus geerntet. Dazu wurden die Rouxschalen bei -20° C eingefroren. Nach zweimaligem Auftauen und Wiedereinfrieren wurde nochmals aufgetaut und dann die Zellreste bei 500 x g abzentrifugiert (Christ Minifuge). Anschließend erfolgte eine Lagerung des Überstandes in Portionen à 5 ml bei -70° C.

Zur Bestimmung des Virusgehaltes wurde eine Portion aufgetaut und auf dichtgewachsenen sekundären ENL-Röhrchenkulturen titriert. Nach Verdünnung des Virus in 10-er Potenzen im Erhaltungsmedium wurden die Kulturen mit je 0,1 ml der Verdünnungen 10^{-3} bis 10^{-8} (vier Röhrchen pro Verdünnungsstufe) beimpft. Es erfolgte täglich eine lichtmikroskopische Überprüfung der Kulturen bis zum achten Tag post inoculationem (p.i.) auf CpE. Der Virustiter wurde nach der Methode von KAERBER berechnet (36).

3.1.6. Reisolierung von Orf-Virus aus Biopsiematerial

Nach chirurgischer bis zum Stratum basale reichender Entfernung einer Pocke wurde diese in einem Mörser verrieben und in ca. 5 ml EARLE-MEM mit den oben genannten Antibiotikazusätzen aufgenommen. Das Material wurde dann auf Zellkulturen (ENL-Monolayer) geimpft (0,2 ml auf eine Röhrchenkultur), die anschließend täglich auf CpE überprüft wurden (43).

3.1.7. Virusfällung mit Polyäthylenglykoll

Für einen Intrakutantest wurde mit Polyäthylenglykoll (PEG-6000) gefälltes Virus als Antigen verwendet. Hierzu wurden in 1000 ml der 55. BEL-Passage des Orf-Stammes D 1701 mit einem Titer von 10^8 KID₅₀/ml 90 g PEG und 21 g Natriumchlorid (NaCl) gelöst, dann bei 4° C mit dem Magnetrührer 16 Stunden gerührt und anschließend 30 min bei 8000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in etwa 1 ml Tris EDTA NaCl-Puffer (TEN-Puffer), ph 7,5, aufgenommen. Die anschließende Titration in der Mikroplatte ergab einen Titer von $10^{8,1}$ KID₅₀/ml. Die elektronenoptische Kontrolle dieses Materials führte zur Beur-

teilung: Reine Parapox-Virione ++++.

3.1.8. Durchführung der Impfung

10 Lämmer wurden im Alter von zwei Wochen mit $1,5 \text{ ml} \approx 10^{7,03} \text{ KID}_{50}$ des Impfstoffes subkutan an den unbehaarten Hautstellen unter der Achsel geimpft. Nach vier Wochen erfolgte in gleicher Weise die Revaccination.

Zwei Ziegen wurden im Alter von 14 Wochen zum ersten Mal ebenso wie die Lämmer subkutan geimpft. Nach vier Wochen erfolgte die zweite Impfung.

Die serologische Kontrolle erfolgte wöchentlich mit dem Mikroneutralisationstest und dem ELISA.

3.1.9. Durchführung der Belastungsinfektionen

3.1.9.1. Intravenöser Challenge

Die intravenöse Belastung mit dem Orf-Virus-Feldstamm erfolgte bei allen vaccinierten Lämmern 10 Tage nach der zweiten Impfung. Die nicht geimpften Kontrolltiere wurden dann mit demselben Feldvirus infiziert, wenn sie das gleiche Alter erreicht hatten.

Die erste Gruppe Nr. 1 (drei geimpfte Tiere) wurde mit $10 \text{ ml} \approx 10^{8,5} \text{ KID}_{50}$ der dritten ENL-Passage je Lamm infiziert; die zweite Gruppe

Nr. 2 (wiederum drei geimpfte Tiere) erhielt je 1 ml $\hat{=}$ 10^8 KID₅₀ der vierten ENL-Passage als Infektionsdosis i.v. appliziert.

Von den nicht geimpften Tieren erhielten in der einen Gruppe (Nr. 6; sechs Lämmer) drei eine Infektionsdosis von je 10^6 KID₅₀ und drei je eine Dosis von je 10^7 KID₅₀ und in der anderen Gruppe (Nr. 7; vier Lämmer) zwei je eine Dosis von 10^8 KID₅₀ und zwei je eine Dosis von $10^{8,5}$ KID₅₀ der vierten ENL-Passage des Orf-S1 Japan Stammes.

Um festzustellen, ob nach einer Wiederholungsinfektion mit dem Orf-S1 Stamm ein Boostereffekt bei der Antikörperbildung eintritt, wurden die geimpften Tiere der Versuchsgruppe 1 fünf Wochen nach dem Challenge noch einmal mit 10^8 KID₅₀ der vierten ENL-Passage dieses Virusstammes intravenös infiziert.

3.1.9.2. Intrakutantest

Zum Nachweis einer zellulären Immunität wurde der Intrakutantest eingesetzt. Kontrolliert wurden 14 Lämmer, die in verschiedene Gruppen aufgeteilt worden waren. 12 Tiere hatten vor dem Test schon Antigenkontakt, zwei waren nicht geimpft und wurden im Isolierstall gehalten. Die Durchführung des Tests erfolgte an den wenig behaarten Schenkelinnenflächen und bei der ersten Gruppe (Nr. 1) zusätzlich am Thorax. Als Antigene wurden das Impfvirus Orf-Virus D 1701 G 008, der Feldstamm Orf-Virus S1 Japan in verschiedenen Verdünnungen, sowie, nach Behandlung mit PEG-6000, die 55. BEL-Passage der Orf D 1701 Stammes verwendet. Als Negativkontrolle wurden bei allen Tieren ENL-Zellkulturüberstände eingesetzt; als Positivkontrolle diente das Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) in einer Konzentration von 0,1 mg/0,1 ml. Mit der Positivkontrolle sollte bei jedem Tier die zelluläre Immun-Reaktionsfähigkeit über das Hautorgan nachgewiesen werden.

Vor der Injektion der Antigene in die Haut erfolgte die Messung der

Hautdicke an den entsprechenden Stellen mit einem Kutimeter (Feder-Kutimeter nach Götze, Fa. Hauptner, Solingen). Bei den Lämmern erfolgte täglich eine Untersuchung der Haut auf Veränderungen.

3.1.9.3. Skarifikationsversuch

Vier Lämmer (zwei geimpfte und zwei nicht geimpfte als Kontrolle) und drei Ziegen (zwei geimpfte und eine nicht geimpfte) wurden unter den Achseln und an den Schenkelinnenflächen skarifiziert.

Die kutane Infektion erfolgte nach der Herzberg-Methode. Hierzu wurde die Haut zunächst enthaart, mit Wasser und Seife gereinigt und mit einer Impflanzette in einem Quadrat von 5 cm x 5 cm leicht aufgerauht und gereizt, ohne daß es zu Blutungen kam (traumatische Quaddelbildung). In die Quadrate wurde 0,1 ml des Virus eingerieben. Die betroffenen Hautstellen wurden täglich auf etwaige Veränderungen untersucht.

Die geimpften Tiere wurden 10 Tage nach der zweiten Impfung im Skarifikationsversuch belastet, die nicht geimpften Kontrolltiere dann, wenn sie das gleiche Alter erreicht hatten.

Die Infektion erfolgte bei allen Tieren mit dem Orf-S1 Japan Feldstamm der vierten ENL-Passage in unverdünnter Form und mit den Verdünnungen 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} .

3.1.10. Mikroneutralisationstest

3.1.10.1. Absorption der Seren

Da auf Grund einer toxischen Wirkung der Lammseren für die BEL-Zellkulturen ein Auswerten erster Neutralisationsteste nicht möglich war, wurde versucht, eventuell vorhandene toxische Serumkomponenten durch Absorbieren zu eliminieren. Es wurden mehrere Verfahren erprobt (Chloroformbehandlung, Kaolinbehandlung, hochtouriges Zentrifugieren). Als Reinigungsverfahren hat sich folgende Technik am besten bewährt: Die Seren wurden zunächst bei 56° C eine halbe Stunde im Wasserbad inaktiviert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

Zur Absorption wurden sekundäre BEL-Zellen mit STV abgelöst und zweimal mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung (NaCl-PP), ph 7,5, gewaschen. 0,5 ml Serum wurden anschließend mit 0,5 ml NaCl-PP (1 : 1) versetzt. In dieser Serumverdünnung wurden gewaschene und sedimentierte BEL-Zellen in einer Konzentration von etwa 10^8 Zellen/ml resuspendiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37° C im Schüttelapparat wurden die Zellen 10 min bei 400 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand nochmals bei 1000 x g 15 min zentrifugiert (Christ Minifuge), um restliche Partikel zu beseitigen, und bis zur Untersuchung im Neutralisationstest bei -20° C gelagert.

3.1.10.2. Neutralisationstest

Der Test wurde in Mikroflachbodenplatten (Micro Test III, 96 Well, Falcon Williams Drive Oxnard, USA) als Serumneutralisationstest durchgeführt. Als positive Kontrolle diente ein institutseigenes

Schafserum (Nr. 7) gegen Orf-Virus.

Die Seren wurden beginnend mit einer 1 : 4 Verdünnung in zweier-Potenzen in MEM + 5 % FKS in der Platte verdünnt. In jede Vertiefung wurde die gleiche Menge Virus inokuliert. Der Impfstamm Orf-Virus D 1701 in der dritten BEL-Passage, auf ca. 100 KID₅₀/0,1 ml eingestellt, kam zur Verwendung. Pro Verdünnungsstufe wurden vier Kavitäten beimpft. Nach Verschließen der Platten mit steriler Abdeckfolie erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 37° C und 5 % CO₂-haltiger Atmosphärenluft. Danach wurden sie 16 Stunden bei +4° C gehalten. Um festzustellen, wie sich eine 18stündige Inkubationszeit bei 37° C auf den Antikörpertiter und die Viruskontrolle auswirkt, wurde ein Teil der Seren und die Viruskontrolle zusätzlich in dieser Weise getestet (es erfolgte hierbei keine Lagerung im Kühlschrank).

Am nächsten Tag wurden, nachdem sich die Platten auf Raumtemperatur erwärmt hatten, sekundäre BEL-Zellen (5×10^5 /ml) in MEM + 5 % FKS resuspendiert und in einem Volumen von 0,1 ml/Kavität auf die Platten gegeben. Anschließend kamen die Platten zur Inkubation in den CO₂-Brutschrank. Die Kulturen wurden täglich abgelesen; die Endablesung erfolgte am sechsten Tag.

3.1.11. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.1.11.1. Virusanreicherung

Als Ausgangsmaterial für die Antigenbereitung diente die dritte BEL-Passage des Orf-Virus D 1701. Die Titration im Röhrchen ergab einen Titer von $10^{7,5}$ KID₅₀/ml; diejenige in der Mikroplatte einen Titer von $10^{6,55}$ KID₅₀/ml. Das Virus wurde aufgetaut, beschallt und anschließend bei 400 x g in der Minifuge zentrifugiert. Der klare

Überstand wurde im Verhältnis 1 : 2 auf ein 34 %iges Succhrose-Kissen geschichtet und 90 min bei 20 000 U/min in der Ultrazentrifuge (Beckmann-Rotor SW 28) zentrifugiert. Das am Boden des Röhrchens angesetzte Sediment wurde in einigen Millilitern TEN-Puffer, ph 7,5, aufgenommen.

3.1.11.2. Verwendete Puffer-Lösungen

Carbonat-Bicarbonat-Puffer, ph 9,6, als Beschichtungsmedium (Coating Buffer) für die Antigengebrauchsverdünnung

Na_2CO_3	(Natriumcarbonat)	1,59 g
NaHCO_3	(Natriumhydrogencarbonat)	2,93 g
Aqua dest.		ad 1000

Phosphatgepufferte physiologische Natriumchlorid-Lösung (PBS), ph 7,4, mit 0,05 % Tween 20 als Serumininkubationsmedium für die Serumverdünnungen und als Waschlösung

NaCl	(Natriumchlorid)	8,0 g
KH_2PO_4	(Kalim Dihydrogenphosphat)	0,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	(di-Natriumhydrogenphosphat-12-hydrat)	2,9 g
KCl	(Kaliumchlorid)	0,2 g
Tween 20		0,5 ml
Aqua dest.		ad 1000

PBS, ph 7,4, mit 5 % FKS als Konjugat-Inkubationsmedium für die Konjugatverdünnung

3.1.11.3. ELISA-Platten

Als Antigen-Träger wurden Flachboden-Microelisaplaten von Nunc Denmark (Immunoplate II 96 F) verwendet.

3.1.11.4. Seren

Als "nicht-Antikörper-haltige" negative Kontrollseren wurden Seren von 30 Lämmern aus einem Betrieb, der seit einem Jahr keine Ecthyma-Ausbrüche nachweisen konnte, ausgewählt. Die Seren stammten von Tieren im Alter von 7 - 10 Wochen, so daß ein Verschwinden maternalen Antikörper angenommen werden konnte. Neutralisierende Antikörper ließen sich bei den Seren nicht nachweisen. Später wurden die Seren gepoolt und als ein negatives Kontrollserum im ELISA verwendet.

Das Schafimmunserum Nr. 7 zeigte im Neutralisationstest einen hohen Antikörpertiter und diente als positive Kontrolle.

3.1.11.5. Konjugat

Bei dem Konjugat handelte es sich um ein gegen Schaf-IgG gerichtetes, vom Kaninchen gewonnenes IgG, das mit dem Enzym Peroxidase konjugiert war (Anti Schaf IgG, (H + L) Rash Nordic 25-884). Das Konjugat lag in lyophilisierter Form vor, wurde mit 1 ml Aqua dest. aufgelöst und dann bei 4° C gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung erfolgte die Verdünnung mit PBS (ph 7,4, 5 % FKS).

3.1.11.6. Substrat

Zitronensäure	4,67 g
Na_2HPO_4 (di-Natriumhydrogenphosphat)	9,15 g
ortho-Phenyldiamin	0,5 g
Aqua dest.	ad 1000

Die Lösung wurde in 20 ml Portionen sofort nach der Herstellung eingefroren und kurz vor Gebrauch im Dunkeln aufgetaut. Unmittelbar vor der Verwendung wurden 0,005 % H_2O_2 (Wasserstoffperoxyd) zugefügt.

Das Enzym Peroxidase katalysiert die Oxidation des ortho-Phenyldiamin durch H_2O_2 . Diese Reaktion wird durch eine gelbe Verfärbung des Substrats sichtbar.

3.1.11.7. Photometrische Messung

Die Messungen erfolgten mit dem Photometer Titertek Multiskan MC, Firma Flow. Die Extinktionswerte, die mit diesem Gerät ermittelt werden können, liegen innerhalb eines Meßbereichs von 0 bis 1,999. Die gewählte Wellenlänge für die photometrische Messung der Färbung war 450 nm.

3.1.11.8. Durchführung des ELISA

Zunächst wurden die Platten mit einer Antigenverdünnung von 1 : 200 in Coating-Puffer beschichtet. Die Verdünnung war zuvor durch eine

gegenläufige Titration des angereicherten Antigens (beginnend bei 1 : 10) gegen das Schafimmenserum Nr. 7 (beginnend bei 1 : 10) als sogenannte Schachbrettitration mit einer Extinktion von ca. 1,000 bei 450 nm ermittelt worden. In jede der 96 Vertiefungen wurden 0,1 ml der Antigenverdünnung pipettiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37° C; danach wurden die Platten 16 Stunden bei 4° C gelagert. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Platten bei - 20° C eingefroren.

Vor Testbeginn wurden die Platten aufgetaut und viermal gründlich mit PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden die Serum-Verdünnungsreihen in zweier-Potenzen ab 1 : 10 in der Platte unter Verwendung einer 12-Kanalpipette (Titertek^R) durch mehrmaliges Aufziehen pro Verdünnungsstufe hergestellt.

Nach der Serum-Inkubation (eine Stunde bei 37° C) und anschließendem dreimaligen Waschen mit PBS + Tween erfolgte die Konjugatzugabe und -Inkubation (wie bei der Serum-Inkubation). Eine Verdünnung des Konjugats von 1 : 2000 wurde vorher als Gebrauchsverdünnung mittels Titration ermittelt. Daran schloß sich erneut ein dreimaliges Waschen an. Nach dem Waschen wurden die Platten an der Luft trockengeschüttelt. Nun wurde das Substrat in die Kavitäten pipettiert. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Schüttern im Dunkeln wurde der Extinktionswert der einzelnen Proben bei 450 nm gemessen.

Um bei der Auswertung unspezifische Serumreaktionen weitestgehend auszuschalten, wurde versucht, einen Extinktionswert als unteren Grenzwert festzulegen. Hierzu wurde von den Extinktionswerten der 30 Seren, die von Orf-Virus-neutralisierenden Antikörpern frei waren, der Mittelwert ausgerechnet und zu diesem die zweifache Standardabweichung addiert. Als Grenzwert wurde eine Extinktion von 0,628 festgesetzt.

Tabelle I:

Zusammenfassende Darstellung der Daten über Impfungen und Testinfektionen bei den einzelnen Versuchsgruppen

Impfung						Testinfektion			
Versuchs-Gruppe	Alter (Wo.) 1. Vak. 2. Vak.	Modus	Impfstoff	Titer des Impfstoffes	Dosis/ Tier	Zahl der Tiere	Modus	Virus	Infektiöse Ein- heiten im Ges. Vol.
1	2	6	sub- cutan	Orf- Vaccine D 1701	1,5 ml	3	i.v.	Orf-Virus SI Japan 3. ENL	10 ^{8,5} KID ₅₀
2	2	6	unter der Achsel	10 ^{7,03} KID ₅₀ / Impfosis		4***	i.c.	Orf-Virus SI Japan 4. ENL Orf-Virus D 1701 PEG gef.	10 ^{7,0} KID ₅₀ 10 ^{7,1} KID ₅₀
3	2	6				3	i.v.	Orf-Virus SI Japan 4. ENL	10 ^{8,0} KID ₅₀
4	2	6				2	i.c.	Orf-Virus SI Japan 4. ENL Orf-Vaccine D 1701	10 ^{7,0} KID ₅₀ 10 ^{5,85} KID ₅₀
5*	14	18				2	kutan	Orf-Virus SI Japan 4. ENL	10 ^{7,0} KID ₅₀
6**						3	i.v.	Orf-Virus SI Japan 4. ENL	10 ^{6,0} KID ₅₀
6**						3	i.v.	Orf-Virus SI Japan 4. ENL	10 ^{7,0} KID ₅₀
7						6	i.c.	Orf-Virus SI Japan 4. ENL	10 ^{7,0} KID ₅₀
8						2	i.v.	Orf-Virus SI Japan 4. ENL	10 ^{8,0} KID ₅₀ 10 ^{8,5} KID ₅₀
9						2	i.c.	Orf-Virus SI Japan 4. ENL	10 ^{7,0} KID ₅₀ 10 ^{5,85} KID ₅₀
10*						2	kutan	Orf-Virus SI Japan 4. ENL	10 ^{7,0} KID ₅₀
						1	kutan	Orf-Virus SI Japan 4. ENL	10 ^{7,0} KID ₅₀

* Bei den Gruppen 5 und 10 handelte es sich um Ziegen.

*** Ein Schaf kam später für den Intrakutantest hinzu und war nicht geimpft.

** Die Gruppe 6 umfaßte 6 Tiere, die zu 2 Versuchen herangezogen wurden.

i.c. = intracutan; i.v. = intravenös

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Impfung mit der Orf-Vaccine

Zehn Schaflämmer wurden im Alter von zwei Wochen zum ersten Mal mit der Orf-Vaccine D 1701 G 008 subkutan an der unbehaarten Hautstelle unter der Achsel geimpft. Die Revaccination erfolgte vier Wochen später. Zwei Ziegenlämmer wurden in gleicher Weise geimpft; sie waren allerdings bei der Primovaccination 14 Wochen alt.

Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Impfung klinisch gesund. Die Tiere standen nach den Impfungen permanent unter tierärztlicher Überwachung. Das Allgemeinbefinden blieb ungestört, die Körpertemperatur im physiologischen Bereich, die Futteraufnahme war normal. An den Impfstellen konnten keinerlei pathologische Reaktionen beobachtet werden. Die Impfungen wurden, wie bereits beschrieben (92), ohne lokale oder systemische Nebenwirkungen vertragen.

3.2.2. Belastung der Tiere mit Orf-Feldvirus

Zur Überprüfung des Immunitätsstatus der Impflinge wurden Belastungen mit Orf-Feldvirus in Form einer intravenösen, einer intrakutanen und einer kutanen Infektion durchgeführt.

Des weiteren wurde eine mögliche humorale Immunantwort mit Hilfe des Serumneutralisationstest und des ELISA untersucht.

3.2.2.1. Intravenöse Belastung

Als systemische Form der Belastungsinfektion wurde eine intravenöse Applikation von Orf-Feldvirus über die Vena jugularis sowohl bei geimpften wie auch bei nicht geimpften Tieren vorgenommen. Insgesamt standen für diesen Versuch 16 Lämmer zur Verfügung, von denen sechs geimpft (Gruppe 1 und 2) und zehn nicht geimpft (Gruppe 6 und 7) waren. Die Versuche wurden nicht zur gleichen Zeit durchgeführt, da die Lämmer zeitlich verschoben eingestellt und gehalten wurden.

Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion alle sieben-einhalb Wochen alt, so daß bei den geimpften Tieren die Belastung zehn Tage nach der zweiten Impfung erfolgte.

Von den geimpften Tieren zeigten diejenigen, die mit der extrem hohen Dosis von $10^{8,5}$ KID₅₀ Feldvirus infiziert worden waren (Gruppe 1), am Tage nach der intravenösen Infektion klinisch eine deutliche Mattigkeit, die über weitere zwei Tage anhielt. Bei einem Lamm wurde an den beiden Tagen post infectionem eine über den physiologischen Bereich hinausgehende Temperaturerhöhung ($40,7^{\circ}\text{C}$) gemessen, die sich am dritten Tag wieder normalisiert hatte. Bei den anderen beiden Lämmern dieser Gruppe konnten nur sehr leichte Temperaturanstiege gemessen werden, die jedoch nicht den febrilen Bereich erreichten. Bei diesen letztgenannten Tieren traten an den Prädilektionsstellen (Lippenwinkel) am 14. bzw. 15. Tag nach der Infektion jeweils eine leichte Rötung auf. Innerhalb einer Woche entwickelte sich bei beiden Tieren an diesen Stellen eine kleine Pocke, die aber schon nach zwei Tagen ausgeheilt war. Eine Biopsieprobe des veränderten Gewebes, die in einem Mörser steril verrieben und auf ENL-Monolayer-Röhrchenkulturen verimpft worden war, verursachte am 3. Tag post inoculationem in diesen Zellkulturen einen zytopythischen Effekt in Form von 30 - 40 % Zellabkugelungen und 5 - 10 % Zytolyse. Im Elektronenmikroskop waren in Proben infizierter ENL-Zellen typische Parapox-Virione sichtbar.

Bei den geimpften Lämmern der Gruppe 2, die mit $10^{8,0}$ KID₅₀ des Orf-

Feldvirus intravenös infiziert worden waren, kam es zu keinen klinischen Erscheinungen nach der Infektion. In keinem Fall wurden Veränderungen an den Prädilektionsstellen für Ecthyma über den Beobachtungszeitraum von vier Wochen gesehen.

Bei den nicht geimpften Tieren kam es nach der intravenösen Belastung mit den verschiedenen Virusverdünnungen weder zu lokalen noch systemischen Erscheinungen einer Parapoxinfektion. Lediglich bei einem Tier, das das Feldvirus in einer Dosis von $10^{8,5}$ KID₅₀ erhalten hatte, konnte 24 Stunden nach der Injektion Fieber von 41° C gemessen werden. Am darauffolgenden Tag hatte sich aber bei diesem Tier die Körpertemperatur wieder normalisiert.

3.2.2.2. Intrakutantest

Zur Überprüfung der zellulären Parapocken-Immunität wurden insgesamt 14 Lämmer einem Intrakutantest unterzogen. Es handelte sich um die Versuchsgruppen 1, 2, 3, 6, 8 und ein institutseigenes Schaf. Diese Testmethode wurde somit an geimpften Tieren (Gruppe 3), an geimpften und anschließend mit Feldvirus intravenös belasteten Tieren (Gruppe 1), nicht geimpften, aber intravenös mit Feldvirus belasteten Tieren (Gruppe 6) sowie an nicht geimpften und unbelasteten Kontrolltieren (Gruppe 8) durchgeführt.

Die Antigene wurden in einer Dosis von 0,1 ml streng intrakutan an der seitlichen Thoraxwand und/oder der Schenkelinnenfläche injiziert. Unmittelbar nach der intrakutanen Injektion entstand an der Injektionsstelle eine etwa linsengroße Quaddel, die nach einer Stunde vollkommen verschwunden war.

3.2.2.2.1. Intrakutantests an geimpften und intravenös belasteten Tieren (Gruppe 1)

Die Ergebnisse des Intrakutantests bei den Tieren der Versuchsgruppe 1 und dem institutseigenen nicht geimpften Schaf sind in den Abbildungen 2, 3 und 4 sowie in den Tabellen 2 und 3 zusammengefaßt. Die Hautdickenzunahme wurde prozentual zur Ausgangshautdicke an der Injektionsstelle angegeben, um einen Vergleich zwischen der Hautreaktion an der seitlichen Thoraxwand und der Schenkelinnenfläche zu ermöglichen.

Bei dem nicht geimpften Lamm (ohne Nummer) konnten schon nach 7 1/2 Stunden besonders starke Reaktionen auf das Virus festgestellt werden. Sie äußerten sich in sehr starken Rötungen verbunden mit erheblichen Schwellungen, die aber schon nach 23 Stunden drastisch zurückgegangen waren. Die Reaktion auf das Mitogen PHA entsprach derjenigen, die auch bei den anderen beiden Tieren (Nr. 93 und 95) festgestellt wurden. Die Hautveränderungen in Form von Rötung und Schwellung erreichten nach 23 Stunden ihren Höhepunkt und waren nach 47 Stunden wieder in Rückbildung. Die Hautdickenzunahme (12 %) blieb während des Beobachtungszeitraums unverändert.

Bei den geimpften Lämmern (Nr. 93 und 94) waren nach 7 1/2 Stunden nur sehr geringgradige Veränderungen in Form von sehr leichten Rötungen und Schwellungen und sehr geringer Zunahme der Hautdicke sichtbar. Zu diesem Zeitpunkt waren bei dem geimpften Lamm Nr. 95 an den Schenkeln etwas stärkere Reaktionen in Form von mittelgradiger Rötung, leichter Schwellung und stärkerer Zunahme der Hautdicke (1,0 mm) als an der seitlichen Brustwand zu erkennen. Lediglich der Orf-S1 Stamm Japan rief hier eine sehr leichte Schwellung (geringe Zunahme der Hautdicke) hervor. Nach 23 Stunden kam es bei den geimpften Lämmern (Nr. 93, 94 und 95) zu einer starken Reaktion auf die Parapox-Virus-Antigene und das Mitogen PHA. Deutliche Rötungen und Schwellungen verbunden mit erheblicher Zunahme der Hautdicke konnten nun festgestellt werden. Nach 47 Stunden erreichten überall Rö-

tung, Schwellung und Hautdickenzunahme ihren Höhepunkt, während eine Reaktion auf den virusfreien ENL-Zellkulturüberstand an den Injektionsstellen ausblieb.

Zu diesem Zeitpunkt wurden Biopsieproben der veränderten Haut entnommen, von denen histologische Schnitte angefertigt wurden*, um die pathologisch-histologischen Veränderungen der Haut darzustellen. Bei den geimpften Tieren wurde an den Stellen, an denen die Antigene und das PHA injiziert worden waren, eine starke Auflockerung des Bindegewebes im Corium, die durch die Ödematisierung hervorgerufen worden war, festgestellt. Des weiteren waren im Corium an den Reaktionsstellen massive Anhäufungen von mononukleären Zellinfiltraten, die für die allergische Hautreaktion vom verzögerten Typ kennzeichnend sind, zu sehen.

Alle Tiere reagierten auf die intrakutane Applikation von PHA mit einer deutlichen Hautdickenzunahme, jedoch bei jedem Tier mit anderer Kinetik als auf die Orf-Antigenapplikation (siehe Abb. 2 und 3).

Was die Wahl der Injektionsstelle für Intrakutantests betrifft, zeigte sich, daß die dünne empfindliche Haut an den Schenkelinnenflächen am besten geeignet war. Weitere Tests bei den Versuchsgruppen 3, 6 und 8 wurden daher nur noch an diesen Hautpartien durchgeführt.

* Für die Anfertigung und HE-Färbung der Schnitte im Institut für Embryologie und Histologie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H.-G. Liebich bedanken.

Hautdicken-
zunahme
(mm)

- 37 -

● — ● PHA
▲ — ▲ Orf-Virus D 1701
○ — ○ Orf-S1 Virus

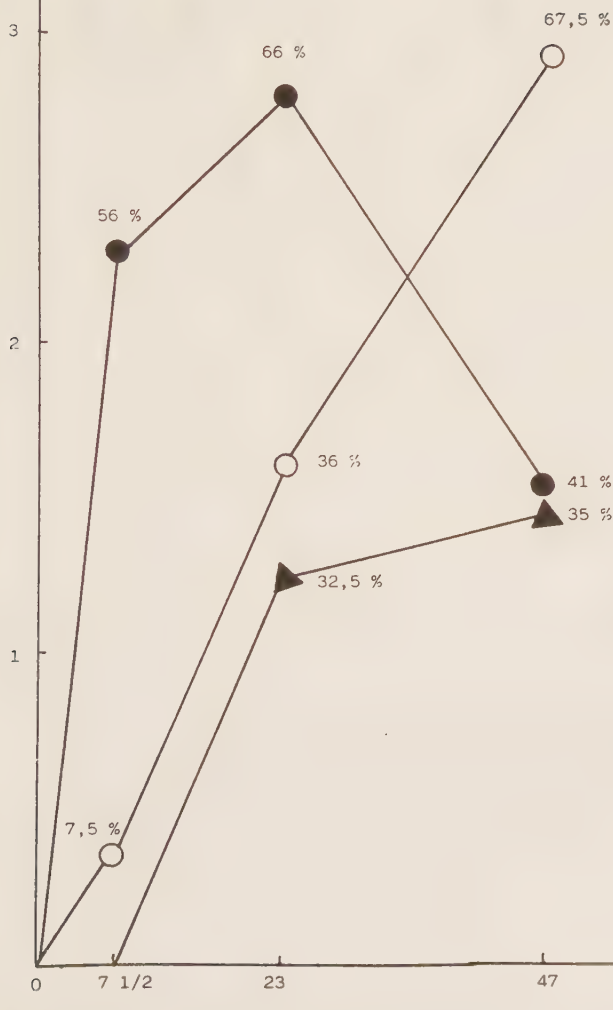


Abb. 2: Ergebnisse der Hautdickenzunahme bei geimpften und intravenös belasteten Tieren im Intrakutantest am Thorax (Versuchsgruppe 1; Zunahme der Hautdicke in Millimetern (mm); Durchschnittswerte von 2 Lämmern)

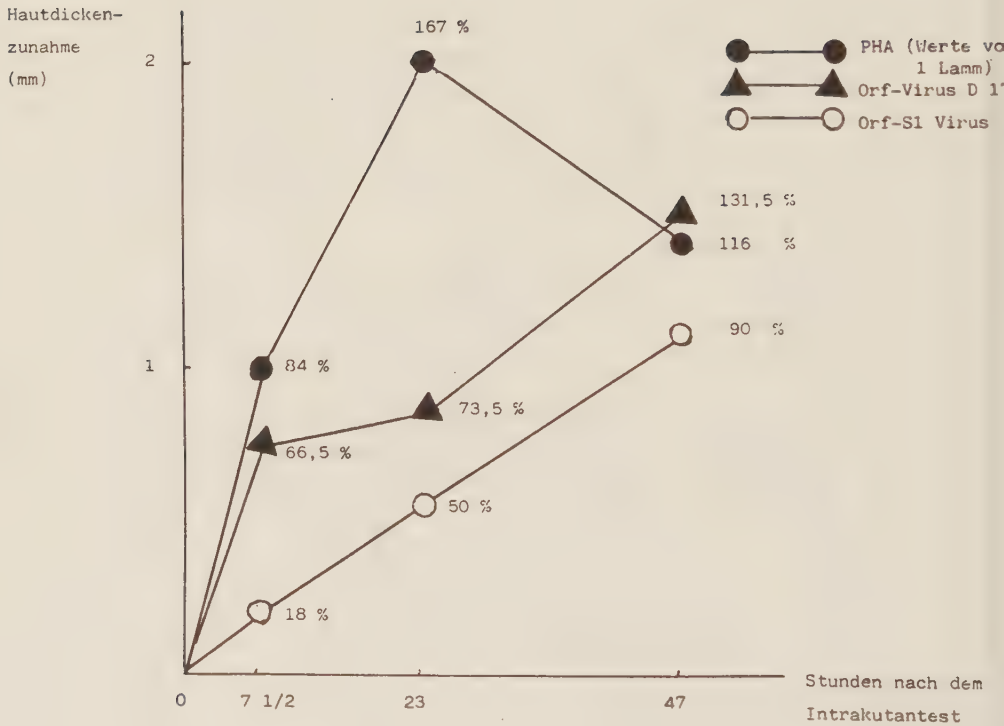


Abb. 3: Ergebnisse der Hautdickenzunahme bei geimpften und intravenös belasteten Tieren im Intrakutantest an den Schenkelinnenflächen (Versuchsgruppe 1; Zunahme der Hautdicke in (mm); Durchschnittswerte von 2 Lämmern)

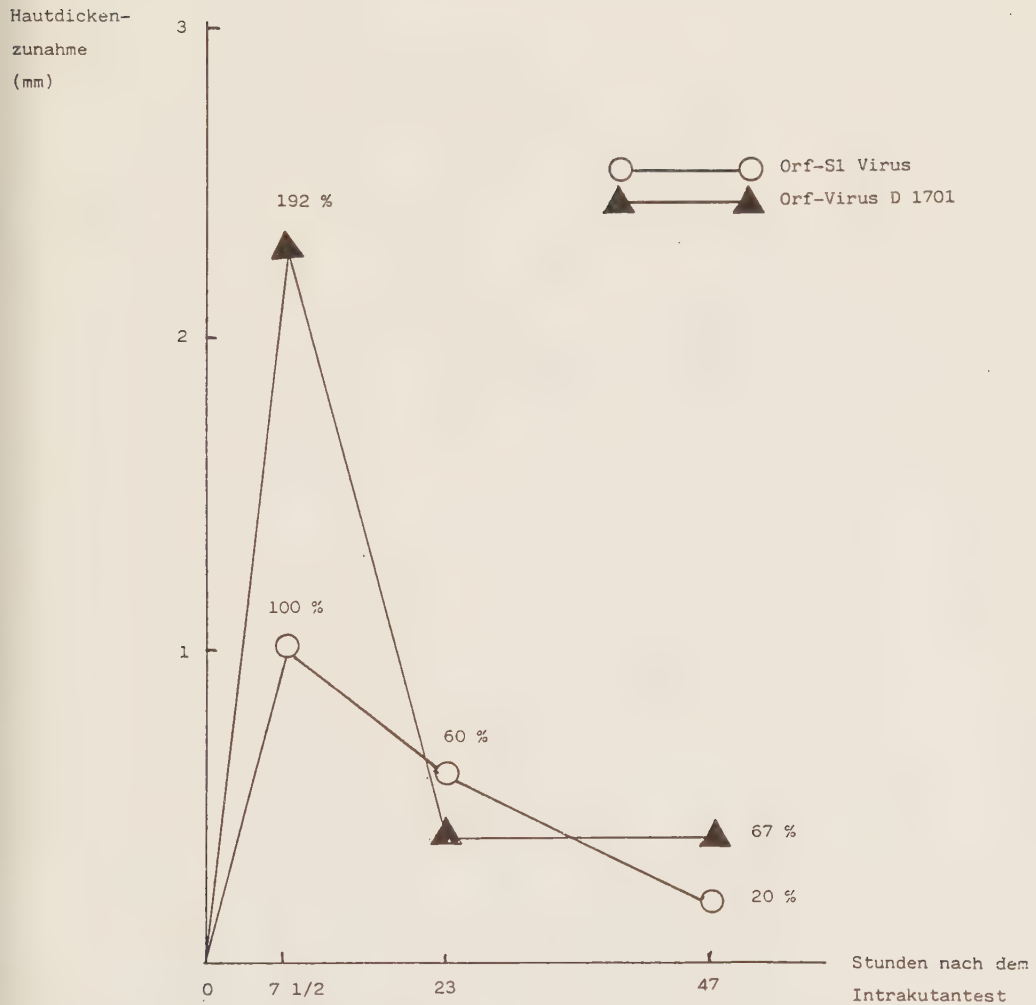


Abb. 4: Ergebnisse der Hautdickenzunahme bei dem nicht geimpften instituts-eigenen Lamm (ohne Nummer) an den Schenkelinnenflächen
(Zunahme der Hautdicke in Millimetern (mm))

Tabelle 2:

Rötung und Schwellung der Haut nach dem Intrakutantest am Thorax bei geimpften und intravenös belasteten Tieren.
(Versuchsgruppe 1)

Antigen	Schaf	7,5 h Rötung _{1/2} Schwellung	Rötung	23 h Schwellung	Rötung	48 h Schwellung
PHA	Nr. 93.	+	+	+	+	++
	ohne Nr.	++	-	+	-	+
Orf/PEG	Nr. 93	-	-	+	-	+
	Nr. 95	-	+	+	+	++
Orf S1 Japan	Nr. 93	-	-	-	R -	-
	Nr. 95	-	+	+	R +	++

PHA = Phytohämagglutinin +++ stark
(0,1 mg/0,1 ml) ++ mittel
Orf/PEG = Orf-Virus D 1701 + leicht
PEG gereinigt

55. BEL

Titer: $10^{8,1}$ KID₅₀/ml

Orf S1 Japan = Orf-Virus

S1 Japan

2. BET, 4. ENL

Titer: $10^{8,0}$ KID₅₀/ml

Tabelle 3:

Rötung und Schwellung der Haut nach dem Intrakutantest am Schenkel bei geimpften und intravenös belasteten Tieren
(Versuchsgruppe 1)

Antigen	Schaf	7,5 h Rötung Schwellung	23 h Rötung Schwellung	48 h Schwellung
PHA	Nr. 95	++ +	+ +	+ +++
Orf/PEG	Nr. 94	-	++	+++
	Nr. 95 ohne Nr.	++ ++	+ - ++	+++ +
Orf S1 Japan	Nr. 94	-	+ +	+++
	Nr. 95 ohne Nr.	++ ++	+ + +	+++ -

PHA = Phytohämagglutinin +++ stark
(0,1 mg/0,1 ml) ++ mittel

Orf/PEG = Orf-Virus D 1701 + leicht

PEG gereinigt

55. BEL

Titer: $10^{8,1}$ KID₅₀/ml

Orf S1 Japan = Orf-Virus

S1 Japan

2. BET, 4. ENL

Titer: $10^{8,0}$ KID₅₀/ml

3.2.2.2.2. Intrakutantests an nicht geimpften, aber intravenös belasteten Tieren (Gruppe 6)

In einen zweiten Versuch wurden sechs Tiere einbezogen, die ohne vorausgegangene Vaccination mit dem Orf-Virusstamm S1 Japan mit $10^{6,0}$ bzw. $10^{7,0}$ KID₅₀ intravenös infiziert worden waren (Gruppe 6). Die Lämmer wurden nach 24, 47, 69 Stunden und weiterhin täglich bis zum Abheilen der aufgetretenen Reaktionen untersucht. Die Hautreaktionen verliefen bei allen sechs Tieren in ähnlicher Weise. Nach 24 Stunden waren deutliche Zunahmen der Hautdicke verbunden mit mittelgradigen Schwellungen und Rötungen an den Stellen, an denen PHA und das Orf S1-Antigen in unverdünnter Form injiziert worden war, zu sehen. Der Höhepunkt der Reaktionen trat bei dem Mitogen PHA schon nach 24, beim unverdünnten Virusantigen ($10^{7,0}$ KID₅₀) nach 47 Stunden und bei der Virusverdünnungsreihe um einige Stunden verzögert ein.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 5 graphisch dargestellt. Es sind Durchschnittswerte der Hautdickenzunahmen der sechs Lämmer zu verschiedenen Zeiten nach der Applikation der unterschiedlichen Antigenverdünnungen angegeben.

Die Reaktionen verlaufen in ihrer Stärke proportional der injizierten Antigenmenge. Die Entzündungserscheinungen (Schwellungen und Rötungen) ließen in ihrem Verlauf und Ausmaß eine Parallelität zur gemessenen Zunahme der Hautdicke erkennen. Auch bei diesen Tieren rief die intrakutane Applikation von ENL-Zellkulturüberstand als Negativkontrolle keinerlei Veränderungen hervor.

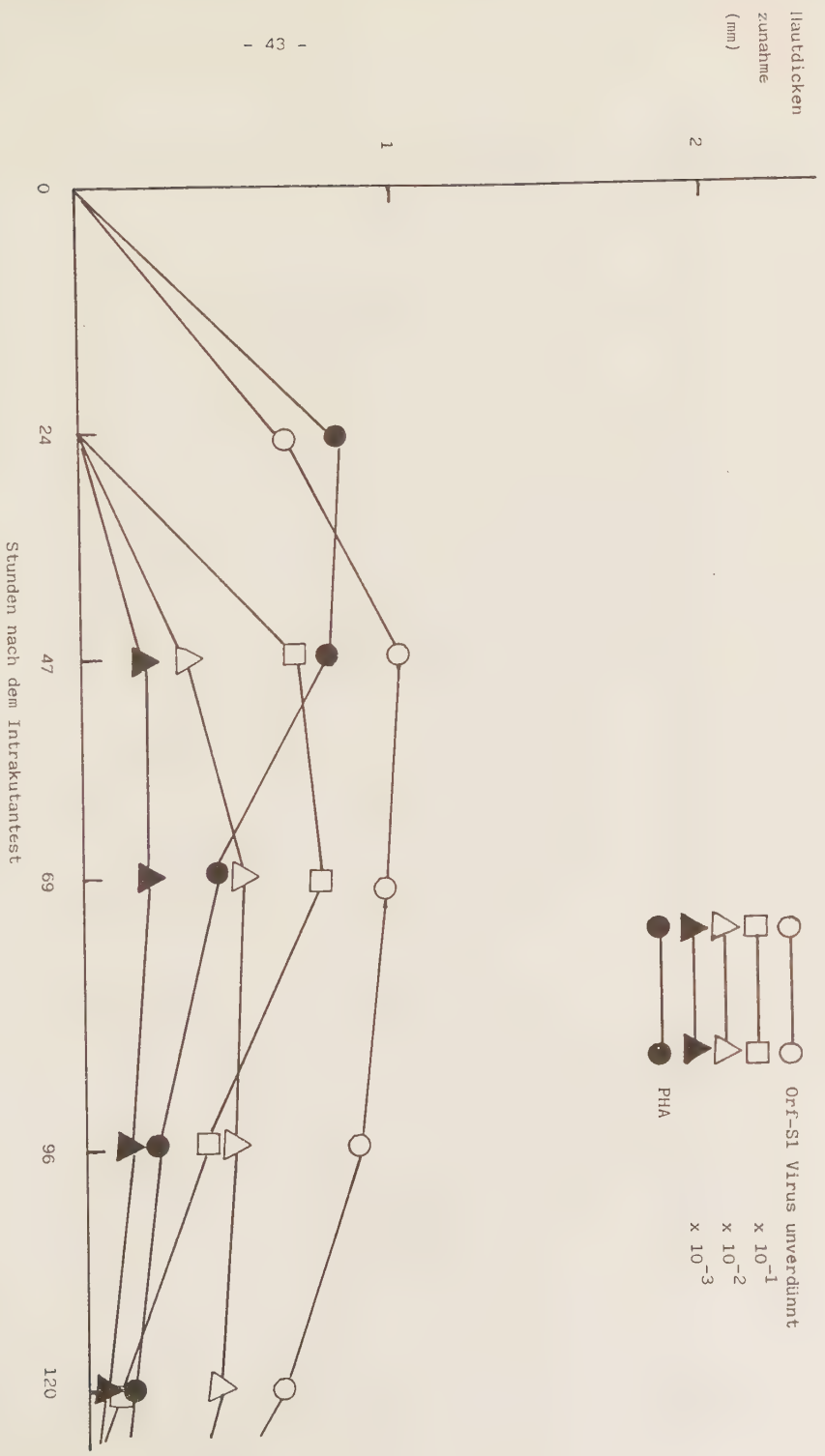


Abb. 5: Ergebnisse der Hautdickenzunahme bei nicht geimpften, aber intravenös belasteten Tieren (Versuchsgruppe 6; Zunahme der Hautdicke in Millimetern (mm); Durchschnittswerte von 6 Lämmern)

Tabelle 4:

Rötung und Schwellung der Haut nach dem Intrakutantest bei nicht geimpften und intravenös belasteten Tieren (Versuchsgruppe 6; Durchschnittswerte von sechs Lämmern)

Antigen	24 h	47 h	69 h	96 h	120 h
Orf Sl-Virus	R +	R ++	R ++	R +	R +
$\times 10^{-1}$	S -	S ++	S +	S +	S -
$\times 10^{-2}$	R -	R ++	R +	R +	R +
$\times 10^{-3}$	S -	S ++	S +	S +	S +
PHA	R -	R +	R +	R +	R +
	S -	S +	S +	S -	S -
	R +	R ++	R -	R -	R -
	S +	S ++	S -	S -	S -

R = Rötung

S = Schwellung

+++ stark

++ mittel

+ leicht

PHA = Phytohämagglutinin (0,1 mg/0,1 ml)

Orf Sl-Virus = Orf-Virus Sl Japan 2.BET; 4.ENL

Titer: $10^{8,0}$ KID₅₀/ml

3.2.2.2.3. Intrakutantests an geimpften und nicht belasteten Tieren (Gruppe 3)

In dieser Tiergruppe wurde der Test bei zwei geimpften Lämmern (Gruppe 3) zehn Tage nach der zweiten subkutanen Impfung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 graphisch dargestellt.

Die Reaktionen waren hier bei beiden Tieren allgemein stärker als bei den nicht geimpften, aber belasteten Tieren: Auffallend ist, daß hier alle Virus-Antigene nach 47 Stunden die stärksten lokalen Hautreaktionen hervorriefen. Bis zur 69. Stunde gingen die Veränderungen wieder leicht zurück, danach erfolgte ein weiterer Rückgang. Die stärksten Veränderungen wurden durch das Orf-Virus S1 Japan durch Induktion einer Hautdickenzunahme von fast 2 mm nach 47 Stunden verursacht. Die Reaktionen auf verdünntes Orf S1-Virus ließen eine deutliche Dosis-Wirkungs-Relation erkennen. Selbst bei einer Verdünnung des Antigens von 10^{-3} war aber eine deutliche Hautreaktion mit einem Dickenzunahmemaximum nach 47 Stunden zu beobachten. Die Vermehrung der Hautdicke nach dem Intrakutantest mit dem Impfvirus war ebenfalls deutlich ausgeprägt und erreichte eine Zunahme von mehr als 1 mm nach 47 Stunden. Im Verlauf entsprach die Kurve der Hautdickendurchschnittswerte, gemessen an zwei Lämmern nach der intrakutanen Injektion dieses Antigens, etwa derjenigen nach Injektion des Orf S1-Antigens.

Im Gegensatz zu diesen Reaktionsabläufen erreichte die Hautreaktion auf das Mitogen PHA bereits nach 24 Stunden ihren Höhepunkt, um schon nach 47 Stunden erheblich nachzulassen. Auch hier wurden Rötungen und Schwellungen quantitativ parallel zur Hautdickenzunahme beobachtet. Die Stärke der Reaktionen in Relation zur Menge der verwendeten Antigene verdeutlichte erneut den Verdünnungseffekt. Ebenso wie in den vorherigen Versuchen konnten hier auf die Injektion von ENL-Zellkulturüberstand als Kontrolle keinerlei Reaktionen beobachtet werden.

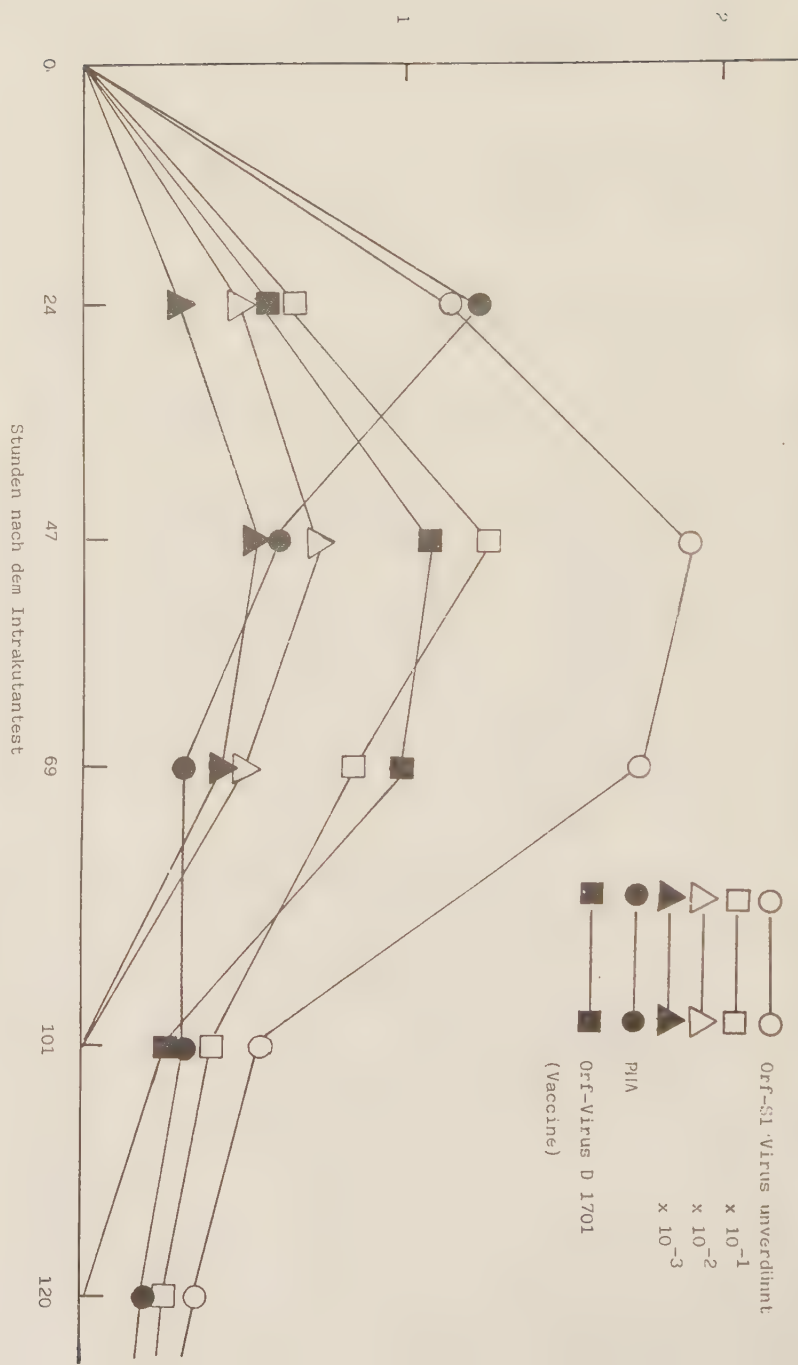


Abb. 6: Ergebnisse der Hautdickenzunahme bei geimpften und nicht belasteten Tieren im Intrakutantest

(Versuchsgruppe 3; Zunahme der Hautdicke in Millimetern (mm); Durchschnittswerte von zwei Tieren)

Tabelle 5:

Rötung und Schwellung der Haut nach dem Intrakutantest bei geimpften Tieren (Versuchsgruppe 3; Durchschnittswerte von zwei Lämmern)

Antigen	24 h	47 h	69 h	96 h	120 h
Orf Sl-Virus	R +	R +++	R +	R -	R -
x10 ⁻¹	R +	R ++	R +	S -	S -
x10 ⁻²	R +	R ++	R +	S -	S -
x10 ⁻³	R -	R +	R -	S -	S -
Orf-Vaccine	R +	R ++	R +	R -	R -
PHA	R ++	R +	R -	S -	S -

R = Rötung +++ stark PHA = Phytohämagglutinin (0,1 mg/0,1 ml)
S = Schwellung ++ mittel Orf Sl-Virus = Orf-Virus Sl Japan 2. BET; 4. ENL
+ leicht Titer: 10^{8,0} KID₅₀/ml
Orf-Vaccine = Orf-Vaccine D 1701 G 008
Titer: 10^{6,85} KID₅₀/ml

3.2.2.2.4. Intrakutantests an nicht geimpften und nicht belasteten Tieren (Gruppe 8)

An zwei nicht geimpften Lämmern, die ohne Orf-Viruskontakt fünf Wochen im Isolierstall gehalten wurden, wurden die Intrakutantests mit denselben Antigenen durchgeführt. Serologisch ließen sich bei ihnen zum Zeitpunkt des Beginns der Hauttests keine Antikörper im Serumneutralisationstest und im ELISA gegen Orf-Virus nachweisen. Die Reaktionen auf das Mitogen PHA entsprachen denen, die bei den anderen Lämmern vorher beschrieben worden waren. Die Tiere hatten demnach ein funktionsfähiges zelluläres Abwehrsystem.

Auf die intrakutane Injektion mit dem ENL-Zellkulturüberstand war auch bei diesen Tieren keine zelluläre Hautreaktion diagnostizierbar.

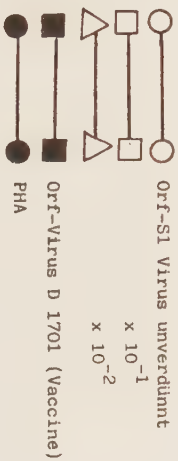
Die Reaktion der beiden Tiere auf die intrakutane Injektion mit den Virus-Antigenen nahm jedoch einen völlig anderen Verlauf wie bei den infizierten oder immunisierten Tieren der vorher beschriebenen Gruppen:

Bei Lamm Nr. 386 reagierte das Hautorgan nach 48 Stunden an den Stellen, an denen der Feldvirusstam Orf-S1 Japan unverdünnt ($10^{7,0}$ KID₅₀), in der Verdünnung 10^{-1} ($10^{6,0}$ KID₅₀) und 10^{-2} ($10^{5,0}$ KID₅₀) injiziert worden war, mit hochgradigen Schwellungen und Rötungen sowie starker Berührungsempfindlichkeit. Die Hautdickenzunahme betrug hier 2,5 mm. Am dritten Tag konnte die maximale Hautdickenzunahme von 3 mm gemessen werden. Die Injektionsstellen waren hochgradig gerötet, angeschwollen und sehr schmerzhaft. Am vierten Tag waren diese Symptome weitestgehend wieder abgeklungen. An der Injektionsstelle der Antigenverdünnung 10^{-1} bildete sich noch eine stecknadelkopfgroße Rötung. Am fünften Tag waren außer je einer stecknadelkopfgroßen Rötung an den mit unverdünntem Feldvirus und der 10^{-1} -Verdünnung inokulierten Hautstellen keine Veränderungen mehr zu sehen. Am sechsten Tag bildete sich an den vorher beschriebenen

3. Hautdicken-
zunahme
(mm)

1

2



Pockenbildung

Pockenbildung

49

1

2

0

24

48

72

96

120

144

Abb. 7: Ergebnisse der Hautdickenzunahme bei nicht geimpften Kontrolltieren im Intrakutantest

(Versuchsgruppe R: Zunahme der Hautdickenzunahme in Millimetern, jeweils Durchschnittswert von zwei Tieren)

Stunden nach dem
Intrakutantest

Tabelle 6:

Klinische Beobachtungen nach dem Intrakutantest bei nicht geimpften Tieren (Versuchsgruppe 8)

Antigen	Schaf	1. Tag R S	2. Tag R S	3. Tag R S	4. Tag R S	5. Tag R S	6. Tag R S
PHA	Nr. 369	+	+	-	-	-	-
	Nr. 386	++	++	-	-	-	-
Orf S1 Japan	Nr. 369	-	-	++	+++	stecknadelkopf- große Rötung	eine Pocke
	Nr. 386	-	+++ Sch +++	Sch ++ +++ Sch +++	++ Sch +	stecknadelkopf- große Rötung mit Pustel	eine Pocke
Orf S1 Japan-1 x 10 ⁻¹	Nr. 369	-	-	-	-	-	-
	Nr. 386	-	+++ Sch ++	++ Sch +	stecknadelkopf- große Rötung	stecknadelkopf- große Rötung mit Pustel	eine Pocke
Orf S1 Japan-2 x 10 ⁻²	Nr. 369	-	-	-	-	-	-
	Nr. 386	-	+++ Sch ++	+ Sch +	-	-	-
Orf- Vac- cine D 1701	Nr. 369	-	-	+	-	-	-
	Nr. 386	-	-	++ Sch ++	-	-	-

R = Rötung (ø ca 2 cm)

+++ stark

S = Schwellung

++ mittel

Sch = Schmerzhaftigkeit

+ leicht

PHA = Phytohämagglutinin (0,1 mg/0,1 ml)

Orf S1 Japan = Orf-Virus S1 Japan 2. BET; 4. ENL

Titer: 10^{8,0} KID₅₀/mlOrf-Vaccine D 1701 G 008; Titer: 10^{6,85} KID₅₀/ml

Stellen je eine Hauteffloreszenz. Diese entwickelten sich am nächsten Tag zu pustulösen Pocken, die schließlich in den darauffolgenden Tagen unter Bildung von Granulationsgewebe verschorften und in den kommenden beiden Wochen völlig ausheilten. Bei dem zweiten Lamm (Nr. 369) nahm die Reaktion einen etwas schwächeren Verlauf. Am dritten Tag konnten erhebliche Rötungen und Schwellungen festgestellt werden, die am vierten Tag ihren Höhepunkt erreichten. An der mit unverdünntem Feldvirus behandelten Hautstelle zeigte sich am fünften Tag post inoculationem eine stechnadelkopfgroße Rötung, die sich am nächsten Tag zu einer Pocke entwickelte.

Im Gegensatz zu diesen starken Reaktionen auf das Feldvirus verliefen die Hautreaktionen auf das intrakutan applizierte Impfvirus bei den Tieren wesentlich schwächer. Vorübergehend war zwar eine geringe Berührungsempfindlichkeit neben Rötung und Schwellung an den Injektionsstellen festzustellen, jedoch bildeten sich im weiteren Verlauf keine Pocken.

Während des ganzen Beobachtungszeitraums wurde bei keinem der Tiere eine Störung des Allgemeinbefindens und Erhöhung der Körpertemperatur festgestellt.

3.2.2.3. Skarifikationsversuch

Die Skarifikation stellt eine alternative Methode zum Intrakutan-test beim Nachweis einer zellulär verankerten Immunität bei Tieren nach Pockenviruskontakt dar. Auch nach Durchführung dieser Testmethode wurden bei geimpften und nicht geimpften Tieren unterschiedliche Reaktionen der Haut auf Orf-Feldvirus beobachtet.

Die nach Skarifizierung entstandenen Pocken beschränkten sich bei allen Tieren auf die skarifizierten Hautareale, es kam zu keiner generalisierten Reaktion.

Alle nicht geimpften Tiere (Gruppe 9 und 10) reagierten im Bereich der skarifizierten Hautquadrate, die mit dem Orf-Feldstamm S1 Japan mit einem Titer von $10^{7,0} \text{ KID}_{50}$ (unverdünnt) und mit einem Titer von $10^{6,0} \text{ KID}_{50}$ (10^{-1}) infiziert worden waren, mit massiver Pustelbildung. Bei einem nicht geimpften Lamm (Nr. 387) wurden auch bei einem Virus-titer von $10^{5,0} \text{ KID}_{50}$ (10^{-2}) Pustelbildungen in geringer Frequenz beobachtet. An den Skarifikationsstellen, die mit unverdünntem Virus infiziert worden waren, entstanden bei den nicht geimpften Tieren konfluierende Pusteln, die fast das ganze skarifizierte Feld einnahmen. Nach der Infektion mit der 10^{-1} -Verdünnung waren im Durchschnitt vier Pocken zu zählen; bei einem Lamm (Nr. 387) fand sich nach Skarifizierung mit der 10^{-2} -Verdünnung nur noch eine Pocke im gesamten Hautareal. An den infizierten Hautstellen der nicht geimpften Tiere entwickelten sich aus den Hauteffloreszenzen typische Parapockenpusteln. Die Reaktionen begannen drei bis vier Tage nach der Skarifizierung mit Rötung und leichter Schwellung, erreichten zwischen dem sechsten und neunten Tag ihren Höhepunkt in Form einer typisch ausgeprägten Pustelbildung mit entzündlicher Reaktion der Umgebung und starker Ödematisierung des Unterhautbindegewebes. Sie bildeten sich unter Eintrocknung und Ausbildung dicker Krusten langsam zurück. Die Rückbildung begann zwischen dem 10. und 14. Tag und dauerte über einen Monat an, bis eine völlige Ausheilung unter Narbenbildung erfolgte.

Bei den geimpften Tieren waren die Entzündungen und Schwellungen bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei den nicht geimpften Tieren, und es kam in keinem Falle zu einer derartig starken Pustel- und Schorfbildung. Die Pusteln traten schon am dritten Tag nach der Infektion auf und begannen schon am darauffolgenden Tag zu verschorfen. Sie heilten in den nächsten sechs Tagen ohne Narbenbildung völlig aus. Eine Ziege und ein Lamm hatten nur an den Stellen, die mit dem unverdünnten Virus infiziert worden waren, Hautveränderungen, bei den anderen beiden Tieren konnten auch bei der 10^{-1} -Verdünnung Reaktionen beobachtet werden. Bei den erstgenannten Tieren konnten zwei Pocken gezählt werden, bei den beiden anderen an der mit unverdünntem Virus infizierten Stelle fünf und bei der 10^{-1} -Verdünnung zwei Pocken.

— Verlaufsforn einer normalen örtlichen Pustelreaktion bei nicht immunen Tieren

— — — Verlaufsforn einer Schnellreaktion bei Tieren mit zellulärer Immunität

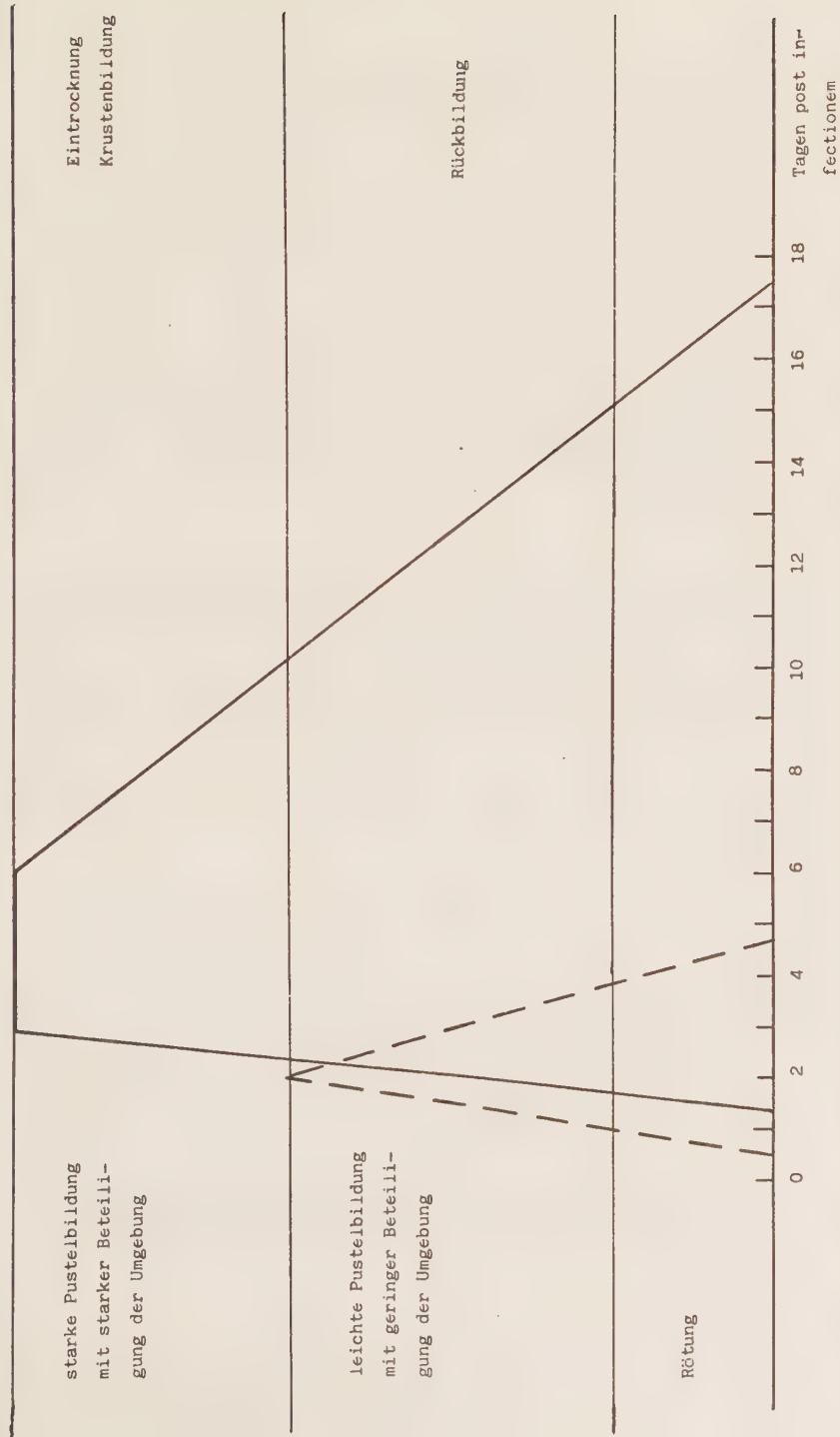


Abb. 8: Verlauf der Hautreaktion nach Skarifikationsversuch, Testinfizierung mit virulentem Orf-Virus SI Japan (schematisch)

Der schematische Vergleich der Reaktion geimpfter (immuner) und nichtgeimpfter Lämmer im Skarifikationsversuch ist in Abb. 8 dargestellt.

3.2.3. Serologie

Neben der Bestimmung der Schutzwirkung durch intravenöse, intrakutane und kutane Testinfektion, wurde versucht, mit Hilfe serologischer Methoden einen Einblick in die humorale Immunantwort gegen Orf-Virus zu bekommen.

Obwohl humorale Antikörper für den Schutz vor einer Erkrankung, die durch Orf-Virus hervorgerufen wird, nur eine geringe Bedeutung haben, kann durch den Aufbau einer humoralen Immunität das Virämiestadium bei einer zyklisch verlaufenden Allgemeininfektion verhindert werden (95). Experimentell ist es wichtig, Anhaltspunkte über den Aufbau und die Persistenz humoraler Antikörper zu finden.

Die Bestimmung der humoralen Antikörper wurde hier im Neutralisationstest und im ELISA versucht.

3.2.3.1. Neutralisationstest

3.2.3.1.1. Auswahl der Methodik

In ersten Versuchen wurden die Seren von geimpften und nicht geimpften belasteten Tieren (Gruppe 1 und 6) getestet. Der Test wurde als

Serumneutralisationstest mit fallenden Serumverdünnungen und konstanter Virusverdünnung (100 KID₅₀) des Orf D 1701-Stammes unter Verwendung von sekundären BEL-Zellen als Indikator durchgeführt. Nach Zugabe der BEL-Zellsuspension (5×10^5 /ml) konnte bei fast allen getesteten Seren auf Grund einer toxischen Komponente vor allem in den niedrigen Verdünnungsstufen kein Zellrasen auswachsen. Es war demzufolge nicht festzustellen, ob das Virus einen CpE hervorrief oder durch eventuell vorhandene Antikörper neutralisiert worden war. Durch Chloroformbehandlung, Kaolinbehandlung oder hochtouriges Zentrifugieren konnte keine Reduktion der toxischen Wirkung der Seren erzielt werden. Eine Inkubation der Seren mit BEL-Zellen hingegen bewirkte eine bis auf wenige Ausnahmen vollständige Beseitigung der Toxizität, so daß alle Seren nach Absorption mit BEL-Zellen getestet wurden.

Des weiteren wurde festgestellt, daß eine 18stündige Inkubationszeit der Serum/Virus-Reaktionsgemische bei 37° C nur inkonstant die neutralisierende Potenz der Seren (Anstieg der Antikörpertiter) erhöhte und bei der Viruskontrolle (Rücktitration) ein Titerabfall eintrat. Die Methode der zweistündigen Inkubation bei 37° C und anschließender 16stündiger Lagerung der Reaktionsgemische bei 4° C erwies sich als gut reproduzierbar.

3.2.3.1.2. Nachweis neutralisierender Serumantikörper

Die Antikörpertiter im Serumneutralisationstest waren im Allgemeinen sehr niedrig (1 : 4 bis 1 : 16). Weder nach Impfungen noch nach Challenge-Infektionen war bei allen Tieren eine einheitlich deutliche Antikörperbildung zu erkennen.

Alle geimpften Schaflämmer (außer Lamm Nr. 81) hatten vor der Impfung neutralisierende Serumantikörper, wahrscheinlich maternaler

Herkunft. Bei den Ziegen ließen sich keine neutralisierenden prä-vaccinalen Antikörper nachweisen.

Nach der ersten Impfung kam es bei fünf Lämmern (Nr. 59, 70, 93, 95 und 338) zu einem Abfall des Antikörpertiters, bei vier Tieren (Nr. 22, 36, 47 und 94) zu einem Antikörperanstieg und bei drei Lämmern (Nr. 53, 81 und 336) zu keiner Veränderung des Spiegels der Serumantikörper. Zwei Wochen nach der Erstimpfung hatten fünf Tiere (Nr. 22, 36, 47, 59 und 81) keine mit diesem Test nachweisbaren Antikörper mehr. Die zweite Impfung führte bei fast allen Tieren zu einem Anstieg der Antikörper, nur bei einem Lamm (Nr. 94) sank der Titer weiter, während er bei einem (Nr. 93) unverändert blieb. Bei zwei Tieren (Nr. 36 und 47) waren im Neutralisationstest keine Antikörper mehr vorhanden.

Nach den Challenge-Infektionen kam es bei drei Tieren (Nr. 81, 93 und 338) in der ersten Woche zu einem Antikörperanstieg, der bei Lamm Nr. 93 über einen längeren Zeitraum anhielt. Bei Lamm Nr. 81 sank nach einer Woche und bei Lamm Nr. 338 nach zwei Wochen dieser höhere Antikörperspiegel wieder ab. Bei den anderen Tieren ging in der ersten Woche nach der Belastungsinfektion der Antikörpertiter zurück. Nach einer Woche zeigte sich bei vier Tieren (Nr. 22, 47, 94 und 95) und nach zwei Wochen bei einem Tier (Nr. 336) ein Titeranstieg. Ein Lamm (Nr. 36) hatte keine zirkulierenden, neutralisierenden Antikörper mehr.

Die geimpften und intravenös belasteten Tiere der Versuchsgruppe 1 (Nr. 93, 94 und 95) wurden fünf Wochen nach dem Challenge einer erneuten Infektion mit dem Orf S1 Japan-Stamm ausgesetzt. Alle drei Tiere reagierten hierauf in gleicher Weise: In der ersten Woche nach der Infektion fielen die Titer neutralisierender Antikörper ab, um dann erheblich anzusteigen (bis 1 : 128). Im Alter von 18 Wochen wurden diese drei Lämmer und ein institutseigenes, nicht vorbehandeltes Lamm einem Intrakutantest unterzogen. Bei dem institutseigenen Lamm ließen sich zu keinem Zeitpunkt vor und nach der Infektion neutralisierende Antikörper nachweisen. Die drei anderen Lämmer hatten

zum Infektionszeitpunkt einen Titer von 1 : 32. Eine Woche später sank der Titer bei Lamm Nr. 93 auf 1 : 4, während er bei den anderen beiden Tieren auf 1 : 64 (Nr. 95) und 1 : 80 (Nr. 94) anstieg. Fünf Wochen später waren bei Lamm Nr. 93 keine Antikörper mehr nachzuweisen, bei Lamm Nr. 94 war der Titer auf 1 : 20 gesunken und bei Lamm Nr. 95 (1 : 64) gleichgeblieben.

Von 10 nicht geimpften Lämmern hatten bis auf drei Ausnahmen (Nr. 386, 387 und 21) alle maternale Antikörper. Zum Zeitpunkt der intravenösen, intrakutanen oder kutanen Infektion waren nur noch bei einem Tier (Nr. 363; Titer: 1 : 4) neutralisierende Antikörper nachzuweisen. Alle anderen Tiere hatten keine Antikörper mehr. Nach der intravenösen (Nr. 80), intrakutanen (Nr. 80 und 386) oder kutanen (Nr. 21) Testinfektion ließen sich bei drei Tieren keine Antikörper nachweisen. Eine Woche nach der Infektion lagen die Titer bei den anderen getesteten Tieren bei 1 : 4; zwei Wochen nach der Infektion lagen sie bei vier getesteten Tieren bei 1 : 4 und bei einem bei 1 : 8. Die Antikörper persistierten allerdings nur für sehr kurze Zeit. Vier Wochen nach der Infektion ließen sich bei keinem Tier mehr Antikörper nachweisen.

Bei den sechs Tieren der Versuchsgruppe 6, die zunächst intravenös infiziert worden waren, hatte der vier Wochen später durchgeführte Intrakutantest keinen Einfluß auf den Titer an neutralisierenden Antikörpern.

3.2.3.2. Serumantikörper im ELISA

Bei den Lämmern waren nur in wenigen Fällen mit dem ELISA Antikörper zu finden. Von den 16 Mutterschafen jedoch, deren Seren getestet werden konnten, verlief nur bei vier Tieren der ELISA Antikörper-Nachweis negativ. Die Titer dieser Seren bewegten sich zwischen

1 : 10 und 1 : 40; ein Schaf hatte sogar einen Titer von 1 : 80. Maternale Antikörper wurden aber nur von vier Schafen an ihre Lämmer weitergegeben. Die Antikörpertiter bei diesen Lämmern stimmten zwei Tage nach der Geburt mit denen der Mütter überein und waren spätestens im Alter von fünf Wochen verschwunden (Tab. 16).

Nach den Impf- und Infektionsversuchen waren nur bei einzelnen Tieren in zwei Versuchsgruppen (1 und 6) mit dem ELISA Antikörper nachweisbar. So kam es bei Lamm Nr. 95 (geimpft und belastet, Gruppe 1) eine Woche nach der Wiederholungsinfektion mit dem Orf-Virusstamm S1 Japan zu einem Titer von 1 : 10, der in den nächsten drei Wochen auf 1 : 40 anstieg und eine Woche nach dem Intrakutantest sein Maximum von 1 : 80 erreichte. Vier Wochen nach dem Intrakutantest war er auf 1 : 40 gesunken. Lamm Nr. 94 (ebenfalls geimpft und belastet, Gruppe 1) hatte zum Zeitpunkt des Intrakutantest einen Antikörpertiter von 1 : 10, der sich auch in den nächsten Wochen nicht veränderte.

Das nicht geimpfte institutseigene Lamm (ohne Nummer) wies vor dem Intrakutantest einen Titer von 1 : 20 auf, der eine Woche nach dem Test auf 1 : 10 abfiel und zwei Wochen später seinen alten Level von 1 : 20 wieder erreichte.

Eine Woche nach dem Intrakutantest war bei Lamm Nr. 86 (nicht geimpft, aber belastet, Gruppe 6) ein Antikörpertiter von 1 : 10 feststellbar. Er war zwei Wochen später auf 1 : 20 angestiegen. Sechs Wochen nach dem Intrakutantest waren keine Antikörper mehr nachzuweisen. Drei andere nicht geimpfte, aber intravenös belastete Tiere (Gruppe 6) hatten sieben Wochen nach dem Intrakutantest einen Titer von 1 : 10 (Nr. 80 und 83) bzw. von 1 : 20 (Nr. 82).

Tabelle 7:

Neutralisierende Antikörper bei geimpften, intravenös belasteten und im Intrakutantest untersuchten Tieren (Gruppe 1)

Zeitpunkt	Titer (Serumendverdünnung) bei Tier Nr.			
	93	94	95	ohne Nr.
1. vacc.	1 : 8	1 : 8	1 : 16	n.t.
1 Wo. p. vacc.	1 : 4	1 : 16	1 : 4	n.t.
2 Wo. p. vacc.	1 : 8	1 : 8	1 : 16	n.t.
2. Vacc.	1 : 4	1 : 8	n.t.	n.t.
4 Tg. a. inf.	1 : 4	1 : 8	1 : 8	n.t.
inf. 10 Tg.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
p. vacc.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
3 Tg. p. inf.	0	1 : 4	1 : 16	n.t.
1 Wo. p. inf.	1 : 4	1 : 4	0	n.t.
2 Wo. p. inf.	1 : 8	0	1 : 4	n.t.
3 Wo. p. inf.	1 : 16	n.t.	1 : 80	n.t.
4 Wo. p. inf.	n.t.	n.t.	1 : 80	n.t.
2. inf. (S1)	0	1 : 128	1 : 40	n.t.
1 Wo. p. vacc.	0	0	1 : 8	n.t.
2 Wo. p. vacc.	0	1 : 4	1 : 32	n.t.
3 Wo. p. vacc.	1 : 4	1 : 8	1 : 64	n.t.
4 Wo. p. vacc.	1 : 4	1 : 8	1 : 64	0
Intrakutantest	1 : 32	1 : 32	1 : 32	0
1 Wo. p. i.c.	1 : 4	1 : 80	1 : 64	n.t.
4 Wo. p. i.c.	0	n.t.	n.t.	0
5 Wo. p. i.c.	0	1 : 20	1 : 64	0
13 Wo. p. i.c.	1 : 8	n.t.	n.t.	n.t.

n.t. = nicht getestet; vacc. = Impfung; p. vacc. = nach der Impfung

inf. = Belastungsinfektion; p. inf. = nach der Belastungsinfektion

a. inf. = vor der Belastungsinfektion; p. i.c. = nach dem Intrakutantest

Tabelle 8:

Neutralisierende Antikörper bei geimpften und intravenös belasteten Tieren (Gruppe 2)

Zeitpunkt	Titer (Serumendverdünnung) bei Tier Nr.		
	36	53	81
3 Tg. alt	1 : 16	1 : 4	0
1. vacc.	1 : 4	n.t.	0
1 Wo. p. vacc.	1 : 8	1 : 4	n.t.
3 Wo. p. vacc.	0	1 : 4	0
2. vacc.	0	0	0
inf.	n.t.	1 : 16	1 : 8
1 Wo. p. inf.	0	1 : 4	1 : 16
3 Wo. p. inf.	0	0	1 : 4

n.t. = nicht getestet; inf. = Belastungsinfektion (10 Tage nach der 2. Impfung); p. inf. nach der Belastungsinfektion
vacc. = Impfung; p. vacc. = nach der Impfung

Tabelle 9:

Neutralisierende Antikörper bei geimpften und im Intrakutantest untersuchten Tieren (Gruppe 3)

Zeitpunkt	Titer (Serumendverdünnung) bei Tier Nr.	
	59	70
1 Wo. alt	1 : 8	1 : 32
1. vacc.	n.t.	n.t.
1 Wo. p. vacc.	1 : 4	1 : 4
2 Wo. p. vacc.	0	1 : 4
2. vacc.	0	1 : 8
Intrakutantest	1 : 4	1 : 4
1 Wo. p. i.c.	0	0

n.t. = nicht getestet; vacc. = Impfung

p. vacc. = nach der Impfung

i.c. = Intrakutantest; p. i.c. = nach
dem Intrakutantest

Tabelle 10:

Neutralisierende Antikörper bei geimpften und skarifizierten Tieren
(Gruppe 4)

Zeitpunkt	Titer (Serumendverdünnung) bei Tier Nr.	
	336	338
2 Tg. alt	1 : 4	n.t.
1 Wo. alt	n.t.	1 : 128
1. vacc.	1 : 8	1 : 16
1 Wo. p. vacc.	1 : 8	1 : 8
3 Wo. p. vacc.	1 : 16	1 : 16
2. vacc.	1 : 4	0
1 Tg. a. ska.	1 : 16	1 : 4
Skarifikation	n.t.	n.t.
2 Wo. p. ska.	0	1 : 8
3 Wo. p. ska.	1 : 4	1 : 4

n.t. = nicht getestet; vacc. = Impfung;

p.vacc. = nach der Impfung

ska. = Skarifikation; a. ska. = vor der

Skarifikation; p. ska. = nach der Skarifikation

Tabelle 11:

Neutralisierende Antikörper bei geimpften und skarifizierten Tieren
(Gruppe 5)

Zeitpunkt	Titer (Serumendverdünnung) bei Tier Nr.	
	22	47
2 Wo. a. vacc.	0	0
1. vacc.	n.t.	n.t.
1 Wo. p. vacc.	1 : 4	1 : 4
2 Wo. p. vacc.	0	0
3 Wo. p. vacc.	0	0
2. vacc.	0	0
Skarifikation	1 : 8	0
1 Wo. p. ska.	0	0
3 Wo. p. ska.	1 : 8	1 : 4

n.t. = nicht getestet; vacc. = Impfung

p. vacc. = nach der Impfung

ska. = Skarifikation; p. ska. = nach der
Skarifikation

Tabelle 12:

Neutralisierende Antikörper bei nicht geimpften, intravenös belasteten, und anschließend im Intrakutantest untersuchten Tieren (Gruppe 6)

Zeitpunkt	Titer (Serumendverdünnung) bei Tier Nr.					
	80	82	83	84	85	86
2 Tg. alt	1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 32	1 : 8
1 Wo. alt	1 : 4	1 : 8	1 : 32	1 : 4	1 : 4	1 : 8
2 Wo. alt	1 : 4	1 : 4	1 : 16	1 : 8	n.t.	1 : 16
3 Wo. alt	1 : 4	1 : 4	1 : 4	0	1 : 8	1 : 16
4 Wo. alt	0	1 : 4	1 : 4	1 : 8	1 : 4	1 : 8
5 Wo. alt	0	1 : 4	0	1 : 8	n.t.	1 : 4
6 Wo. alt	0	1 : 4	n.t.	0	0	1 : 4
inf.	0	0	0	0	0	0
2 Wo. p. inf.	0	1 : 8	1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 4
3 Wo. p. inf.	0	0	1 : 4	1 : 4	0	1 : 8
Intrakutantest	0	0	1 : 4	0	0	1 : 4
1 Wo. p. i.c.	0	0	0	0	0	0
2 Wo. p. i.c.	0	0	0	0	1 : 4	1 : 4
3 Wo. p. i.c.	0	0	0	0	0	0
5 Wo. p. i.c.	1 : 4	0	0	n.t.	1 : 4	1 : 4
6 Wo. p. i.c.	0	0	0	0	0	0
8 Wo. p. i.c.	0	0	1 : 4	1 : 8	0	1 : 16

n.t. = nicht getestet; inf. = Belastungsinfektion;

i.c. = Intrakutantest

p. inf. = nach der Belastungsinfektion

p. i.c. = nach dem Intrakutantest

Tabelle 13:

Neutralisierende Antikörper bei nicht geimpften und im Intrakutantest untersuchten Tieren (Gruppe 7)

Zeitpunkt	Titer (Serumendverdünnung) bei Tier Nr.	
	369	386
2 Tg. alt	1 : 4	0
Intrakutantest	0	0
1 Wo. p. i.c.	1 : 4	0
2 Wo. p. i.c.	0	0
3 Wo. p. i.c.	0	0
4 Wo. p. i.c.	0	0

p. i.c. = nach dem Intrakutantest

Tabelle 14:

Neutralisierende Antikörper bei nicht geimpften und skarifizierten Tieren (Gruppe 8)

Zeitpunkt	Titer (Serumendverdünnung) bei Tier Nr.	
	363	387
2 Tg. alt	1 : 4	0
Skarifikation	1 : 4	0
1 Wo. p. ska.	1 : 4	1 : 4
3 Wo. p. ska.	1 : 8	0
4 Wo. p. ska.	0	0

p. ska. = nach der Skarifikation

Tabelle 15:

Im Neutralisationstest nachgewiesene Serum-Antikörper (Serumendverdünnung) bei neugeborenen Lämmern und deren Müttern

Lamm Nr.	Titer der Mutter	Titer der Lämmer im Alter von		
		2 Tagen	1 Woche	2 Wochen
59	1 : 8	n.t.	1 : 8	n.t.
70	1 : 8	n.t.	1 : 32	n.t.
336	1 : 8	1 : 4	n.t.	1 : 8
338	1 : 8	n.t.	1 : 128	1 : 16
80	1 : 16	1 : 4	1 : 4	1 : 4
82	1 : 16	1 : 4	1 : 8	1 : 4
83	1 : 16	1 : 4	1 : 32	1 : 16
84	1 : 8	1 : 4	1 : 4	1 : 8
85	1 : 16	1 : 32	1 : 4	n.t.
86	1 : 16	1 : 8	1 : 8	1 : 16
369	1 : 8	1 : 4	n.t.	n.t.
386	0	0	n.t.	n.t.
363	1 : 32	1 : 4	n.t.	n.t.
387	0	0	n.t.	n.t.

n.t. = nicht getestet

Tabelle 16:

Im ELISA nachgewiesene Antikörpertiter (Serumendverdünnung) bei neugeborenen Lämmern und deren Müttern (nicht geimpfte Tiere)

Lamm Nr.	Titer der Mutter	Titer der Lämmer im Alter von						
		2 Tage	1 Woche	2 Wochen	3 Wochen	4 Wochen	5 Wochen	
83	1 : 10	1 : 10	0	0	0	0	0	
85	1 : 20	1 : 20	1 : 10	0	0	0	0	
86	1 : 40	1 : 40	1 : 20	1 : 10	1 : 10	1 : 10	0	
363	1 : 20	1 : 20	1 : 10	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	

n.t. = nicht getestet

4. Besprechung der Ergebnisse

Die überragende Bedeutung der zellulären Immunität, die von verschiedenen Autoren als essentiell für eine Immunität gegen bestimmte Pockenvirusarten bezeichnet wird (28, 85, 94), konnte bei den Arbeiten mit dem Orf-Virus mittels Challenge und gleichzeitiger Untersuchung humoraler Immunreaktionen bestätigt werden.

Sowohl die Skarifikationsmethode als auch der Intrakutantest bewährten sich hierbei gleichermaßen. Grundsätzlich ließen sich diese Testmethoden an den verschiedensten Hautpartien der Lämmer durchführen. Die ausgeprägtesten, bei allen Tieren auftretenden und am besten meßbaren Reaktionen waren vor allem mit dem Intrakutantest an den Schenkelinnenflächen nachweisbar. Eine Einflußnahme maternaler humoraler Antikörper auf die Ausbildung einer zellulären Immunität gegen das Ecthyma-Virus war nicht feststellbar. Dieses Erkenntnis deckt sich mit der Auffassung von BUDDLE und PULFORD (11).

Mit Hilfe des Intrakutantestes bzw. der Skarifikationsmethode war eine vorhandene und induzierte Immunität der Probanden gegenüber Orf-Virus klar zu erkennen. Wie schon von STICKL et al. bei Vaccinia und Variola demonstriert (83), wurde auch die Haut von Lämmern bei Zweitkontakt mit Orf-Virus zu den typischen Erscheinungen einer allergischen Reaktion vom verzögerten Typ im Intrakutantest bzw. einer Wiederimpfreaktion nach Skarifikation stimuliert, während bei nicht immunen Tieren der Erstkontakt mit virulentem Orf-Virus zu lokalen Krankheitserscheinungen führte, die sich von der allergischen Reaktion bzw. der Wiederimpfreaktion durch ihren zeitlichen Ablauf und durch die massive Infektion der Haut mit anschließender typischer Pockenbildung unterschied.

Bei nicht geimpften, aber intravenös mit dem Feldvirus S1 Japan infizierten Probanden waren die allergischen Hautreaktionen nach dem Intrakutantest nicht so stark ausgeprägt wie bei geimpften Tieren. Dies könnte durch die unterschiedliche immunogene Wirkung der

beiden Virusstämme, durch die unterschiedlichen Applikationsmodi beim Erstkontakt mit dem Virus oder durch beide Möglichkeiten gleichermaßen bedingt sein. Eine Immunität gegenüber Orf-Virus war sowohl nach Impfvirus- als auch nach Feldvirus-Applikation nachweisbar.

Generalisierte Krankheitserscheinungen kamen bei keinem der Probanden nach der lokalen Belastungsinfektion im Intrakutantest vor. Die spezifische zelluläre Immunität gegen Orf-Virusantigene zeigte einen deutlichen Dosis-Wirkungsverlauf auf abgestufte Antigenverdünnungen an den entsprechenden Hautstellen.

Die Ausbildung von lokalisiert auftretenden typischen Parapocken bei nicht geimpften Lämmern nach dem Intrakutantest mit Orf-Feldvirus weist darauf hin, daß bei diesen nicht immunen Tieren lokal die Infektion angegangen ist und entsprechend das klinische Bild des Ecthyma entstand. Die Kontrollversuche mit dem T-Zell-Mitogen PHA beweisen, daß eine Reaktionsfähigkeit der zellulären Abwehr vorhanden war. Hervorzuheben ist, daß an den mit dem Impfvirus intrakutan infizierten Stellen keine Pockenbildung auftrat, jedoch Rötung, Schwellung und Schmerzhaftigkeit beobachtet werden konnten. Derartige Reaktionen blieben aber nach der subkutanen Impfung aus.

Im Skarifikationsversuch kam es bei den nicht geimpften Tieren zur langsamen (Inkubationszeit) Orf-Pustelbildung, während bei den geimpften Tieren eine sogenannte "Schnellreaktion" auftrat (28). Unter Schnellreaktion ist eine Überempfindlichkeitsreaktion (Frühreaktion) bei Wiederimpfungen im Sinne der aus der Humanmedizin bekannten Pockenschutzimpfungsreaktion zu verstehen (28), die sich in den hier durchgeführten Versuchen vom pathologisch-anatomischen Ablauf der Ecthymaentwicklung zeitlich und qualitativ deutlich unterschied. Die Charakteristika einer derartigen Schnellreaktion sind ihr rasches Auftreten (hier 2 Tage p. inf.) und das schnelle Abklingen (hier 8 bis 9 Tage p. inf.). Hierdurch konnte das Vorhandensein einer zellulären Immunität bei den geimpften Tieren nachgewiesen werden.

Der Versuch, eine Immunität nach der Impfung gegen Ecthyma durch eine intravenöse Belastungsinfektion mit einem Orf-Feldvirusstamm in verschiedenen Dosen bei $10^{8,5} \text{ KID}_{50}$ nachzuweisen, war nicht entsprechend der kutanen oder intrakutanen Infektion nachvollziehbar. Die geimpften Tiere hatten keinerlei Anzeichen einer generalisierten Erkrankung in einem Zeitraum von zwei Wochen und länger nach Infektion mit dem Feldvirus Orf SI Japan; jedoch auch ungeimpfte Tiere reagierten lediglich auf die höchste Virusdosis ($10^{8,5} \text{ KID}_{50}$) mit leichten klinischen Symptomen (Fieber), ohne eine Ecthyma-Erkrankung zu erleiden. Eine intravenös durchgeführte Infektion mit Parapoxvirus scheint nur sehr inkonstant eine Erkrankung hervorzurufen, was wohl mit dem Status des unspezifischen und spezifischen Anteils der zellulären Immunität eines belasteten Tieres zusammenhängt. Beim derzeitigen Durchseuchungsgrad der Schafpopulation in der Bundesrepublik dürften intravenöse Challenge-tests nur mit spezifisch pathogen-frei (SPF) und kolostrumfrei aufgezogenen Lämmern sinnvoll und statistisch abzusichern sein. Ein früherer Versuch mit dem Stomatitis-capulosa-Virus bei einem Kalb, durch intravenöse Belastung eine Erkrankung auszulösen, gelang erst, nachdem das nicht geimpfte Tier vor der intravenösen Infektion massiv mit einem Immunsuppressivum behandelt worden war (13).

Eine humorale Immunreaktion auf das Ecthyma-Virus war zwar bei vielen Tieren nach Orf-Virus Kontakt, sei es durch Impfung, sei es durch Infektion mit virulentem Feldvirus, erfolgt, die Titer neutralisierender Serumantikörper waren aber sehr niedrig. Auch ließen sich nur schwer Zusammenhänge zwischen einem erfolgten Antigenkontakt und der Höhe der Antikörpertiter erkennen. Der Nachweis neutralisierender Antikörper bedeutete also nur, daß das betreffende Tier eine Auseinandersetzung mit Orf-Virus (meist mehrmals) hatte. Es kann keine Aussage über den Grad einer eventuell vorhandenen Immunität gemacht werden. Sofern keine Antikörper gefunden werden, kann überhaupt keine Aussage über den Immunstatus getroffen werden. Diese Erkenntnis deckt sich wiederum mit den Ergebnissen von BUDDLE und PULFORD (11).

Daß maternale Antikörper gegen Orf auf Lämmer übertragen werden

(8, 11, 39, 52, 73, 80), wurde auch mit den hier durchgeführten Untersuchungen bestätigt. Ebenso war offensichtlich, daß ältere Tiere (Mutterschafe) häufiger Serumantikörper mit höheren Titern haben, die sowohl im Neutralisationstest wie auch im ELISA nachweisbar waren.

Als die sensiblere Methode zum Nachweis humoraler Antikörper gilt der ELISA. Die in anderen Arbeiten beschriebene Durchführung der Virusreinigung zur Testplattenbeschichtung (11, 40) lieferte keine befriedigenden Ergebnisse, so daß hier eine andere Methode der Antigenpräparation zur ELISA-Durchführung ausgearbeitet wurde. Die Resultate der ELISA-Antikörper-Nachweise wichen größtenteils stark von den im Neutralisationstest erzielten Ergebnissen ab. Es wurden nur bei wenigen Tieren Antikörper gefunden. Der Grund hierfür ist darin zu suchen, daß im ELISA die niedrigste Serumverdünnung 1 : 10 gewählt wurde, da es bei stärkerer Serumkonzentration wegen zu starker Hintergrundwerte der im Neutralisationstest seronegativen Proben zu ungenauen Meßergebnissen kommt. Die niedrigste Serumverdünnung im Neutralisationstest konnte aber bei 1 : 4 festgesetzt werden. Zudem kann angenommen werden, daß mit beiden Tests unterschiedliche Antikörper nachgewiesen werden (40).

Die hier durchgeführte Wirksamkeitsprüfung einer Orf-Lebendvaccine bestätigte auf der einen Seite erneut die schon von ZACH festgestellte Unschädlichkeit der Vaccine (95) und verdeutlichte auf der anderen Seite eine für diese Pockenvirus-Spezies typische zelluläre Reaktionsweise immuner Tiere auf verschiedene an der Haut durchgeführte Challenge-Infektionen mit virulentem Feldvirus. Der Vergleich der Reaktionen von Lämmern nach einer intravenösen Applikation von Orf-Feldvirus mit den Reaktionen des Hautorgans ergab, daß der Nachweis einer Immunität gegen Orf-Virus einzig durch die Überprüfung des zellulären Immunstatus erbracht werden kann.

In vivo ist dies am besten mit dem Intrakutantest oder durch eine Skarifikation mit geeigneten Orf-Virusantigenen möglich. Der Nachweis humoraler Antikörper kann lediglich Auskunft darüber geben, daß eine

Auseinandersetzung mit dem Erreger stattgefunden hat. Für die Impfstoff-Wirksamkeits-Überprüfung bietet die zelluläre (Haut-)Reaktion auf erneuten Antigenstimulus in Form der sogenannten "Schnellreaktion" eine ideale Möglichkeit, immune von nicht immunen (nicht geimpften) Tieren zu unterscheiden. Eine intravenös durchgeführte Belastungsinfektion darf unter den derzeitigen Bedingungen (hoher Durchseuchungsgrad) und wegen der Versuchsvoraussetzungen (SPF-Tiere, kolostrumfreie Aufzucht) für die Praxis als ungeeignet bezeichnet werden.

4. Zusammenfassung

Mit Hilfe kontrollierter Belastungsinfektionen des Hautorgans von Lämmern (intrakutaner und kutaner Challenge) konnte die Wirksamkeit einer neuen Orf-Vaccine basierend auf dem plaquegereinigten Parapox ovis Virusstamm D 1701 nachgewiesen werden.

Durch die Provokation einer Allergie vom verzögerten Typ (Intrakutantest) und durch Erzeugung einer Wiederimpfreaktion (Skarifikation) konnte die zelluläre Abwehr als Basiskomponente der Immunität gegen Orf-Virus auch quantitativ erkannt und bestätigt werden.

Die Reaktion des Hautorgans auf das Mitogen PHA (Phytohämagglutinin) war bei allen getesteten Lämmern beweisend für ein intaktes zelluläres Immunsystem, zeigte aber in Kinetik, Qualität und Quantität der Entzündungsreaktion ein anderes Bild als die Reaktionen auf Orf-Virusantigen

Eine intravenös durchgeführte Belastungsinfektion zum Nachweis einer Ecthyma-Immunität beim Schaf ist für die Praxis ungeeignet.

Der Nachweis von Serum-Antikörpern mit dem Neutralisationstest gelang bei allen Probanden (geimpft, belastet, nicht geimpft, nach Skarifizierung oder Intrakutantest) in unterschiedlichem Ausmaß von negativen Titern bis zu Titern von 1 : 128 ohne klar ersichtliche Korrelation zur jeweiligen Virus-Applikationsform und -Menge, jedoch häufiger nach mehrmaliger Virus-Antigen-Verabreichung. Im ELISA wurden bei Muttertieren Serumantikörper nachgewiesen, die als passiv vermittelte maternale Antikörper wieder in dem Serum der entsprechenden Lämmer mit diesem Test in korrelierenden Titern zu finden waren.

Auswirkungen unterschiedlicher Antikörpertiter auf zelluläre Hautimmunreaktionen sowie umgekehrt Orf-Antigen-Applikationen (intrakutan, Skarifizierung) in die Haut auf eine Antikörperbildung konnten nicht festgestellt werden.

5. Summary

Experimental Studies on the Efficacy of an Orf Live Vaccine against Pustular Dermatitis (Ecthyma) in Sheep

The efficacy of a new Orf (contagious ecthyma)-vaccine, based on the plaque-purified attenuated Parapox virus ovis strain D 1701, was proven by skin-challenge tests with lambs (intradermally and by scarification).

The provocation of a delayed type hypersensitivity-reaction (intra-dermal application of Orf-virus) and the phenomenon of a so-called "revaccination/reaction" (scarification with virulent Orf-virus) accentuated the significance of cellular immunity against Orf-virus infections in a dosedependant manner.

The reaction of the skin to the mitogen PHA (Phytohaemagglutinin) indicated a functional cellular immune system in all lambs tested. The skin reaction against various Orf-virus antigens proved different in quality, quantity and kinetics.

An intravenously performed challenge for the demonstration of an immunity against ecthyma of sheep is unsuitable in practice.

With the neutralization test antibodies could be found in different quantities from non-detectable up to titers of 1 : 128 in the sera of all tested animals (vaccinated, challenged intravenously, by scarification and intradermally) without apparent correlation to the manner and quantity of virus-application in each case. Antibodies were detected more frequently after multiple virus-antigen applications. With the ELISA antibodies in the sera of ewes were detected which were found again as passively acquired antibodies in the sera of their lambs in correlating titers.

A connection could not be established between different antibody-titers and cellular immune reactions of the skin which, in their turn, when stimulated by Orf-virus application into the skin (intradermally, by scarification) had no influence on antibody formation.

8. Literaturverzeichnis

- 1) Abdussalam, M., Contagious pustular dermatitis. IV.
1958: Immunological reactions
 J. comp. Path. 68, 23-35
- 2) Appleyard, G., An antigenic difference between intra-
H.J. Hapel and cellular and extracellular rabbit pox
E.A. Boulter, virus
1971: J. gen. Virol. 13, 9-7
- 3) Arik, F., Serological studies on sheep pox
1967: Pendik vet. Kontrol Ara. Enst. Derg. 1,
 42-51
- 4) Baharsefat, M. and Agglutination test for sheep pox virus
B. Yamini, using antiglobulin
1967: Cornell Vet. 57, 558-563
- 5) Balachandran, N., Use of ⁵¹chromium release test to de-
P. Seth and monstrate antigenic differences between
L.N. Mohapatra, extracellular and intracellular forms
1979: of vaccinia virus
 J. gen. Virol. 45, 65-72
- 6) Blanden, R.V., Mechanisms of recovery from a generalized
1970: viral infection: Mousepox. I. The effects
 of anti-thymocyte serum
 J. Exp. Med. 132, 1035-1054
- 7) Blanden, R.V., Mechanisms of recovery from a generalized
1971: viral infection: Mousepox. II. Passive
 transfer of recovery mechanisms with
 immune cells
 J. Exp. Med. 133, 1074-1089

- 8) Boughton, I.B. and W.T. Hardy, 1934: Contagious ecthyma (sore mouth) of sheep and goats
J. Am. Vet. Med. Assoc. 85, 150-178
- 9) Boulter, E.A., J.C.N. Westwood and H.B. Maber, 1961: Value of serotherapy in a virus disease (rabbitpox)
Lancet November 4th, 1012-1015
- 10) Buddle, B.M., R.W. Dellers and G.G. Schurig, 1984: Contagious ecthyma virus-vaccination failures
Am. J. Vet. Res. 45, 263-266
- 11) Buddle, B.M. and H.D. Pulford, 1984: Effect of passively-acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ecthyma virus
Veterinary Microbiology 9, 515-522
- 12) Buscaglia, C., R.A. Bankowski and L. Miers, 1984: Cell-culture virus-neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of immunity in chickens against fowlpox
Avian Dis. 29, 627-680
- 13) Büttner, M., 1981: Heterologe Schutzimpfung gegen die Stomatitis papulosa mit einem Orf-Lebendimpfstoff
Vet. Med. Diss., München
- 14) Büttner, M., 1985: Ecthyma der Schafe und Ziegen
Tierärztl. Prax. 13, 163-169
- 15) Canić, R., 1935: Vezivanje komplementa ovčjih boginja
Vet. Glasn. 15, 419-423

- 16) Chung, Y.S. and P.B. Spradbrow, 1977: Studies on a poxvirus isolated from a magpie in Queensland
Aust. vet. J. 53, 334-336
- 17) Couzi, G. and J.P. Kircher, 1941: Immunothérapie de la variole
Bull. Inst. Hyg. Maroc. 1, 59-68
- 18) Dales, S. and B.G.T. Pogo, 1981: Biology of poxviruses. In: Kingsburg, D.W.; zur Hausen, H. (edit.): Virology monographs, 18, Springer Verlag, Wien, New York
- 19) Danner, K. und A. Mayr, 1972: Perorale Immunisierung gegen Pocken. 3. Mitteilung: Beziehungen zwischen Impfdosis und Impferfolg bei der Trinkwasservaccinierung gegen Hühnerpocken mit dem attenuierten Stamm HP-1
Zbl. Vet. Med. B 19, 609-614
- 20) Danner, K., M. Herlyn, H. Gerbermann und A. Mayr, 1975: Perorale Immunisierung gegen Pocken. 5. Mitteilung: Belastbarkeit des Impfschutzes nach der Trinkwasservaccinierung gegen Hühnerpocken
Zbl. Vet. Med. B 22, 274-284
- 21) DeMartini, J.C., L.D. Pearson and S.A. Fiscus, 1978: Chromium-51-release assay of antibody and complement-mediated cytotoxicity for contagious ecthyma virus-infected cells
Am. J. Vet. Res. 39, 1922-1926
- 22) Dharsana, R. and P.B. Spradbrow, 1985: The demonstration of cell-mediated immunity in chickens vaccinated with fowl-pox virus
Zbl. Vet. Med. B 32, 628-632

- 23) Dorn, P. und Experimentelle Untersuchungen über prä-
O. Kronthaler, zipitierende Antikörper bei Geflügel-
1965: pocken
Dtsch. Tierärztl. Wchnschr. 72, 169-172

- 24) Frerichs, G.N., Studies on orf virus infections in sheep
1980: PhD Thesis, London University

- 25) Gardner, J., Cell-mediated cytotoxicity against ekstro-
N.A. Bowern and melia-infected target cells.
R.V. Blanden, I. Specifity and kinetics
1974 a: Eur. J. Immunol. 4, 63-67

- 26) Gardner, J., Cell-mediated cytotoxicity against ekstro-
N.A. Bowern and melia-infected target cells
R.V. Blanden, II. Identification of effector cells
1974 b: and analysis of mechanisms
Eur. J. Immunol. 4, 68-72

- 27) Gerbermann, H., Perorale Immunisierung gegen Pocken.
K. Danner und 4. Mitteilung: Beziehungen zwischen
A. Mayr, Attenuierungsgrad des Impfvirus, Virulenz
1973: für das Eintagsküken und Eignung für die
Trinkwasservaccinierung
Zbl. Vet. Med. B 20, 685-695

- 28) Herrlich, A., Die Pocken
1967: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage

- 29) Herrlich, A., Tierexperimentelle Prüfung verschiedener
Ch. Epp und Pockenimpfstoffe im Variola-Belastungs-
A. Mayr, versuch an der weißen Maus
1968: Z. Immun.forsch. 135, 237-245

- 30) Herrlich, A., Das Antikörperbild der Variola-Vaccine-
A. Mayr und Infektion. I. Mitt.: Unterschiedliche
E. Munz, Antikörperentwicklung bei Vaccineinfek-
1956: tion des Kaninchens, Affen und Menschen
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 166, 73-83
- 31) Hirsch, M.S., Cellular immunity in vaccinia infection
A.J. Nahmias, of mice. Anti-thymocyte serum effects
F.A. Murphy and on primary and secondary responsiveness
J.H. Kramer, J. exp. Med. 128, 121-130
1968:
- 32) Hochstein-Mintzel, V., Virulenz und Immunogenität eines modi-
H.Ch. Huber und fizierten Vaccinia-Virus (Stamm MVA)
A. Stickl, Z. Immun.-Forsch. 144, 140-156
1972:
- 33) Horzinek, M. und Serologische Untersuchungen über experi-
W. Höpken, mentelle Ektromelie der Maus
1965: Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 197, 26-33
- 34) Jenner, E., An inquiry into the cause and effects
1798: of the variolae vaccinae, a disease
discovered in some of the western counties
of England, particularly Gloucestershire,
and known by the name of the cow pox
Sampson Low, London
- 35) Jordan, F.T.W. and The agar gel diffusion technique in the
R.C. Chubb, diagnosis of infectious laryngotrache-
1962: itis (I.L.T.) and its differentiation
from fowl pox
Res. vet. Sci. 3, 245-255

- 36) Kaerber, G., Beitrag zur kollektiven Behandlung phar-
1931: makologischer Reihenversuche
Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 162, 480
- 37) Kaplan, C., A note on the immunogenicity of ultra-
D. McClean and violet irradiated vaccinia virus in man
L. Vallet, J. Hyg., Camb. 60, 79-83
1962:
- 38) Kaplan, C., Immunogenicity of ultraviolet-irradiated,
P.F. Benson and non infectious, vaccinia-virus vaccine
N.R. Butler, in infants and young children
1965: Lancet November 4th, 573-574
- 39) Kerry, J.B. and The vaccination of young lambs against
D.G. Powell, contagious pustular dermatitis
1971: Vet. Rec. 88, 671-672
- 40) Koptopoulos, G., Cytotoxic antibodies in Orf virus in-
H.W. Reid and fection of sheep
I. Pow, Zbl. Vet. Med. B 29, 284-291
1982:
- 41) Koszinowski, U. and Target cell-dependent T-cell-mediated
R. Thomssen, lysis of vaccinia virus-infected cells
1975: Eur. J. Immunol. 5, 245-251
- 42) Koszinowski, U. and Role of early viral surface antigens
H. Ertl, in cellular immune response to vaccinia
1976: virus
Eur. J. Immunol. 6, 679-683
- 43) Kretzdorn, D., Untersuchungen über das Vorkommen von
1985: Parapocken bei Rind und Schaf in Japan
Vet. Med. Diss., München

- 44) Le Jan, C., Transfer of antibodies against the CPD
R. L'Haridon, virus through colostrum and milk
M.F. Madelaine and Ann. Rech. Vet. 9, 343-346
C. Cornu,
1978:

- 45) L'Haridon, R. and Problèmes posés par la vaccination con-
J. Asso, tre l'ecthyma contagieux. In: "Les ra-
1975: ces propifiques et autres résultats de
la recherche" - Espèce ovine - Tome
Edition S.P.E.O.C., 149 rue de Bercy
Paris - 12

- 46) Liess, B., Beobachtungen und Untersuchungen über
1962: den Lippengrind (Ecthyma contagiosum)
der Schafe als Zooanthroponose
Zbl. Bakt. I. Orig. 185, 289-304

- 47) Lutu, W.Z., Immunological aspects of Orf in sheep
1971: M. Sc. Thesis, University of Edinburgh

- 48) Martin, W.B., Studies on sheep pox vaccine-serum-virus
M. Erhan and neutralization tests
B. Onar, Pendik vet. Kontrol. Ara Enst. Derg 8,
1975: 26-47

- 49) Mayr, A., Virologische Arbeitsmethoden I/II
P.A. Bachmann, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
B. Bibrack und
G. Wittmann
1974:

- 50) Mayr, A. und Oral immunization against pox.
K. Danner, Studies on fowl pox as a model
1976: Develop. biol. Standard. 33, 249-259

- 51) Mayr, A., Handbuch der Schutzimpfungen in der
G. Eißner und Tiermedizin
B. Mayr-Bibrack, Verlag Paul Parey, Berlin Hamburg
1984:
- 52) Mayr, A., Bekämpfung des Ecthyma contagiosum (Pus-
M. Herlyn, tulardermatitis) der Schafe mit einem
H. Mahnel, neuen Parenteral-Zellkultur-Lebendimpf-
A. Danco, stoff
A. Zach und Zbl. Vet. Med. B 28, 535-552
H. Bostedt,
1981:
- 53) Mayr, A., Perorale Immunisierung gegen Pocken.
M. Rath und 1. Mitteilung: Untersuchung über eine
K. Danner, Schluckimpfung gegen Hühnerpocken mit
1971: dem attenuierten H-Stamm HP-1
Zbl. Vet. Med. B 18, 347-358
- 54) Mc Keever, D., Persistent Orf
1984: The veterinary record 29, 334-335
- 55) Mori, R., The role of the thymus in antibody
K. Kimoto and production and in resistance to Japa-
K. Takeya, nese encephalitis virus infection
1970: Arch ges. Virusforsch 29, 32-38
- 56) Morita, C., Studies on fowl pox viruses. II. Plaque-
1973: neutralization test
Avian Dis. 17, 93-98
- 57) Morita, C., Role of humoral and cell-mediated immu-
1973: nity on the recovery of chickens from
fowl pox virus infection
J. Immunol. 111, 1495-1501

- 58) Moss, B., Glycoproteinsynthesis in cells infected with vaccinia virus. I. Non-virion glycoproteins
E.N. Rosenblum and
C.F. Garon,
1971: Virology 46, 221-232
- 59) Mullbacher, A. and The effect of virus-immune serum on
R.V. Blanden, anti-viral cytotoxic T cells in vivo
and in vitro
1979: J. gen. Virol. 45, 73-80
- 60) Munz, E., Perorale Immunisierungsversuche mit
M. Reimann, Vaccinia Virus gegen Mäusepocken
R. Hoffmann und Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 159,
E. Göbel, 10-30
1974:
- 61) Nagington, J. and Human Orf: Isolation of the virus by
C.H. Whittle, tissue culture
1961: B. med. J. November 8th, 1324-1327
- 62) Panja, G. and zit. nach Boulter et al.
N.N. Das,
1942:
- 63) Patel, T.B. and zit. nach Boulter et al.
B.P.B. Naidu,
1940:
- 64) Pathak, P.N., In vitro cellular immunity to unrelated
G.V.S.V. Rama Rao and pathogens in chickens infected with fowl
W.A.F. Tompkins, pox virus
1974: Inf. Immun. 10, 34-41
- 65) von Pirquet, C., Klinische Studien über Vaccination und
1907: vaccinale Allergie
Deuticke, Leipzig

- 66) Plowright, W. and R.D. Ferris, 1958: The growth and cytopathogenicity of sheep pox virus in tissue plates
Bl. J. Exp. Path. 39, 424-435
- 67) Poulain, J., J.-M. Gourreau and A. Dautigny, 1972: Ecthyma contagieux du mouton: Anticorps sériques neutralisants
Ann. Rech. vétér. 3, 571-579
- 68) Précausta, P., F. Kato and G. Vellut, 1979: A new freeze-dried living virus vaccine against sheep-pox
Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis. 1, 305-319
- 69) Ramyar H. and M. Hessami, 1970: Studies on the duration of immunity conferred by a live-modified sheep pox tissue culture virus vaccine
Zbl. Vet. Med. B 17, 867-874
- 70) Rath, M., 1971: Experimentelle Untersuchungen über eine Trinkwasser-Schutzimpfung gegen die Hühnerpocken
Vet. Med. Diss., München
- 71) Red'Ko, A.S., 1945: Convalescent serum for control of sheep pox in lambs
Veterinariya, Moskow No. 1 p. 21
- 72) Resch, K., 1976: Zelluläre Immunreaktionen. In: Vorlaender, K.-O. (edit.): Praxis der Immunologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- 73) Richter, J. and J. Jansen, 1968: Over de actieve immunisatie van schapen tegen ecthyma. Een praktijkproef met een onverwarmd en een verwarmd autovaccin
Tijdschr. Diergeneesk. 93, 757-773

- 74) Robinson, A.J. and Contagious pustular dermatitis (Orf)
T.C. Balassu, Vet. Bull. 51, 771-782
1981:
- 75) Romero-Mercado, D.H., Virusparticles, antigens and antibodies
1969: in sheep infected with orf, with special
reference to diagnosis
M. Sc. Thesis, University of Edinburgh
- 76) Rottgardt, A.A., Complement fixation test in contagious
H.G. Aramburu and ecthyma
A.J. Garcia-Pirazzi, Nature, Lond. 163, 219-220
1949:
- 77) Rosenthal A.S., Macrophage function in antigen recogni-
J.T. Blake, tion by T-lymphocytes. In: Nelson, D.S.
I.J. Ellmer, (edit.): Immunobiology of the macrophage
D.K. Geinader and Academic Press, New York, San Francisco,
P.E. Lipsky, pp. 131-160
1976:
- 78) Sandritter, W, in: Sanritter, W. und Benneke G. (Hrsg.)
1974: Allgemeine Pathologie
Verlag F.K. Schattauer, Stuttgart, New York
403-445
- 79) Schmidt, D., Experimentelle Beiträge zur Kenntnis der
1967 a: Dermatitis pustulosa des Schafes. V. Un-
tersuchungen über die Ausbildung der Im-
munität gegen das Virus der Dermatitis
pustulosa an verschiedenen Stellen der
Körperoberfläche
Arch. exp. Vet. Med. 21, 937-945

- 80) Schmidt, D., Experimentelle Beiträge zur Kenntnis der
1967 b: Dermatitis pustulosa des Schafes. VI. Die
Spezifität der Komplementbindungsreaktion
mit Dermatitis-pustulosa-Antigen
Arch. exp. Vet. Med. 21, 947-967
- 81) Sen, A.K., Complement-fixation and conglutinating-
P.K. Uppal and complement-adsorption test in sheep pox
P.R. Nilakantan, Indian J. Anim. Sci. 41, 862-863
1971:
- 82) Sharma, S.N., A preliminary note on pathogenicity
P.R. Nilakantan and and antigenicity of sheep and goat pox
M.R. Dhanda, viruses
1966: Indian vet. J. 43, 637-638
- 83) Stickl, H., MVA-Stufenimpfung gegen Pocken
V. Hochstein-Mintzel, Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392
A. Mayr,
H. Schäfer und
A. Holzner,
1974:
- 84) Tripathy, D.N. and Avian pox. In: Hofstad, M.S.; Diseases
C.H. Cunningham, of poultry
1984: Iowa State University Press, Ames, Iowa USA
- 85) Tripathy, D.N. and Immunity to fowlpox
L.E. Hanson, Am J. Vet. Res. 36, 541-544
1975:
- 86) Tripathy, D.N., Passive hemagglutination test with fowl
L.E. Hanson and pox virus
W.L. Myers, Avian Dis. 14, 29-38
1970:

- 87) Trueblood, M.S., An immunologic study of ulcerative der-
T.L. Chow and matitis and contagious ecthyma
L.A. Griner, Am. J. vet. Res. 24, 42-46
1963:
- 88) Tsubahara, H., Complement fixation in fowlpox. II. Com-
H. Sazawa, plement fixation inhibition with fowl
T. Kataoka and serum
H. Kawamura, Bull. Natl. Inst. Anim. Health 31, 59-70
1956:
- 89) Tsubahara, H., Complement fixation in fowlpox. III. Di-
T. Kataoka and rect complement fixation with fowl serum
K. Kato, Bull. Natl. Inst. Anim. Health 41, 6 - 10
1960:
- 90) Uppal, P.K., Studies on sheep pox virus
1963: MVSc Thesis, Agra Univ.
- 91) Uppal, P.K. and Studies on the serological relationships
P.R. Nilakantan; between avian pox, sheep pox, goat pox
1970: and vaccinia viruses
J. Hyg. Camb. 68, 349-358
- 92) Wilkinson, P.B., zit. nach Boulter et al.
1943:
- 93) Wittmann, G., Der Nachweis präzipitierender Antikörper
1958: bei der Hühnerpockeninfektion mit Hilfe
des Agar-Diffusionsverfahrens
Zbl. Vet. Med. B 5, 769-775
- 94) Wittmann, G. und Experimentelle Untersuchungen über die
A. Mayr, Immunität bei Hühnerpocken unter besonderer
1960: Berücksichtigung der Schutzimpfung
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 177, 518-541

- 95) Zach, A., Untersuchungen über Wirksamkeit und Un-
1979: schädlichkeit eines neuen Zellkultur-
 Impfstoffes gegen die Pustuladermatitis
 der Schafe (Ecthyma, Orf)
 Vet. Med. Diss., München

Für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Dr. M. Büttner danke ich für die Hilfe und die jederzeit gegebenen Ratschläge bei der Fertigstellung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Fräulein A. Aigner für die Einarbeitung und Hilfe im Labor.

Lebenslauf

Hildegard, Maria, Frauke von Buchholz geb. Monreal

geboren am 22.08.1959 in Nastätten

Vater: Prof. Dr. Gerhard Monreal; Beruf: Tierarzt

Mutter: Dorothea Monreal geb. Haase; Beruf: Apothekerin

Ostern 1966-

Sommer 1969 Besuch der Schenckendorff-Schule in Koblenz

Sommer 1969-

November 1969 Besuch des staatl. Hilda-Gymnasiums in Koblenz

November 1969-

Ostern 1971 Besuch der Mühlenau-Grundschule in Berlin-Zehlendorf

Ostern 1971-

Sommer 1977 Besuch des Arndt-Gymnasiums in Berlin-Dahlem

09.06.1977 Abitur

August 1977-

April 1978 Auslandsaufenthalte in Schweden und Bahrain

17.04.1978-

30.09.1978 Landwirtschaftliches Praktikum am Institut für Pflanzenbau der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn auf dem Versuchsgut Dikopshof

WS 1978/79-

WS 1979/80 Studium der Landwirtschaft an der Georg-August-Universität Göttingen

SS 1980-

November 1984 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Abschluß Staatsexamen

19.07.1985 Approbation als Tierärztin

05.01.1985 Hochzeit mit dem Tierarzt Dr. Aloys von Buchholz

